T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	光触媒近傍で起こるラジカル的タンパク質ラベル化法を活用した生体分子間相互作用解析法の開発
Title(English)	
著者(和文)	對馬理彦
Author(English)	Michihiko Tsushima
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11984号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 浩之,湯浅 英哉,上田 宏,小倉 俊一郎,林 智広,岡田 智
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11984号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

令和二年度　学位論文

光触媒近傍で起こる
ラジカル的タンパク質ラベル化法を活用した
生体分子間相互作用解析法の開発

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

ライフエンジニアリングコース

對馬　理彦

目次

Abbreviations

第一章「序論」

1-1　ケミカルバイオロジー　2
1-2　アフィニティークロマトグラフィー　3
　1-2-1　アフィニティークロマトグラフィーの原理　3
　1-2-2　アフィニティークロマトグラフィーを用いた
　　リガンド結合タンパク質の同定法　4
　1-2-3　従来までのアフィニティークロマトグラフィーの問題点　5
　1-2-4　ナノアフィニティービーズ　6
1-3　アフィニティーラベリング（親和性標識法）　7
　1-3-1　タンパク質ケミカルラベリング　7
　1-3-2　アフィニティーラベリングの原理　8
　1-3-3　光親和性標識法　9
　1-3-4　アフィニティーラベリングを用いたリガンド結合タンパク質の同定　10
　1-3-5　アフィニティーラベリングの問題点　12
1-4　リガンド指向性化学によるリガンド結合タンパク質ラベル化法　13
1-5　リガンド連結型触媒によるリガンド結合タンパク質ラベル化法　15
1-6　固相上での共有結合形成反応を利用した標的タンパク質の精製　19
　1-6-1　金ナノ粒子上での光親和性標識法による標的タンパク質精製　19
　1-6-2　固相上でのアフィニティーラベリングによる
　　タンパク質の精製・機能化　19
1-7　タンパク質-タンパク質相互作用の解析手法　20
　1-7-1　AP-MS/IP-MS 法による相互作用タンパク質の解析法　20
　1-7-2　HRP 連結抗体を用いた細胞膜上 PPI ラベリング　21
　1-7-3　酵素タグ融合 POI を用いた細胞内環境における
　　相互作用タンパク質ラベル化　22
　1-7-4　可視光照射による POI 相互作用タンパク質ラベル化法　23
1-8　本論文の概要　25
References　29

第二章「リガンド結合タンパク質の精製とラベル化を同時に可能とする光触媒担持アフィニティービーズの開発」

2-1　はじめに　34

2-2　Ru 光触媒の分子設計　35
2-3　光触媒担持アフィニティービーズに最適な Ru 光触媒の開発　36
2-3-1　リンカーの異なる Ru 光触媒誘導体の合成　36
2-3-2　Ru 光触媒 **1**, **2** 担持ビーズのタンパク質吸着性の評価　37
2-3-3　アニオン部位を含有した Ru 光触媒の合成　38
2-3-4　Ru 光触媒 **13** 担持ビーズの作製　38
2-3-5　Ru 光触媒 **13** 担持ビーズのタンパク質吸着性とビーズ表面電位の相関 39
2-4　Ru/dcbpy 光触媒のラベル化触媒能の評価　41
2-4-1　Ru/dcbpy 光触媒の物性評価　41
2-4-2　Ru/dcbpy 光触媒のラベル化能の評価　42
2-5　Ru 光触媒担持アフィニティービーズのタンパク質精製能の評価　45
2-6　Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いた
標的タンパク質の精製およびラベル化　46
2-6-1　BSA, OVA, CA 混在系での標的タンパク質精製・ラベル化の検討　46
2-6-2　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上のラベル化における
リガンド効果の検証　47
2-6-3　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上のラベル化における
ラベル化効率の評価　47
2-6-4　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でラベル化された
CA の酵素活性評価　49
2-6-5　Ru 光触媒担持アフィニティービーズの再利用検討　51
2-7　内在性の微量タンパク質を標的とした標的タンパク質の精製・ラベル化　53
2-8　第二章のまとめ　55
References　56
Experimental section　57

第三章「ラジカル近接ラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) の開発」

3-1　はじめに　72
3-2　TRT をラベル化剤として用いたタンパク質混在系中の
リガンド結合タンパク質ラベル化　72
3-3　ラベル化剤の電気化学特性およびラベル化有効距離の評価　75
3-3-1　TRT およびチロシンの電気化学特性およびラベル化有効距離の評価　75
3-3-2　ラベル化有効距離の小さなラベル化剤の探索　77
3-3-3　リガンド結合タンパク質選択的なラベル化が可能なラベル化剤の選定　79
3-4　MAUra の結合様式の解明　81
3-5　MAUra およびリガンド連結型 Ru 光触媒による
リガンド結合タンパク質選択的ラベル化反応　83

3-6　リガンド連結型 Ru 光触媒下における MAUra のラベル化効率の評価　85
3-7　アフィニティービーズのスクリーニング　88
3-7-1　各アフィニティービーズのリガンド結合タンパク質吸着能の評価　89
3-7-2　各アフィニティービーズを用いた
リガンド結合タンパク質の精製・ラベル化　91
3-7-3　Ru 光触媒担持 FG ビーズおよび Dyna ビーズを用いた
リガンド結合タンパク質ラベル化　91
3-8　リガンド連結型 Ru 光触媒および Ru 光触媒担持アフィニティービーズの比較　93
3-9　第三章のまとめ　95
References　96
Experimental section　97

第四章「弱いリガンド–タンパク質相互作用を解析可能にする光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化法の開発」

4-1　はじめに　108
4-2　糖結合タンパク質（レクチン）のラベル化戦略　108
4-3　*β*-D-ラクトースアミノ化誘導体の合成　110
4-4　Ru 光触媒 **13**／*β*-D-ラクトース担持アフィニティービーズを用いた
PNA ラベル化の検討　111
4-5　Ru 光触媒担持アフィニティービーズの最適な触媒／リガンド担持比の検討　114
4-6　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での多価の結合効果の検証　116
4-7　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での PNA ラベル化効率の評価　118
4-8　Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での PNA ラベル化部位の評価　119
4-9　細胞内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化・同定　122
4-9-1　ビーズ **45** を用いた内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化検討　122
4-9-2　内在性ラクトース結合タンパク質の
ラベル化・nanoLC-MS/MS による同定　122
4-9-3　内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化・2D-DIGE による同定　130
4-10　第四章まとめ　132
References　133
Experimental section　134

第五章「生細胞内での光触媒近接ラベル化を活用したタンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発」

5-1　はじめに　146
5-2　細胞内での タンパク質相互作用ラベル化戦略　147
5-3　細胞内でのタンパク質ラベル化に最適な有機光触媒のスクリーニング　148

5-4　細胞膜上での光触媒近接ラベル化の検討　152
5-5　Acriflavine 光触媒のタンパク質ラベル化様式　155
5-5-1　Acriflavine 光触媒によりラベル化されるアミノ酸残基の同定　155
5-5-2　Acriflavine によるチロシン残基ラベル化の推定反応機構　157
5-6　細胞内での光触媒近接ラベル化（iPPL）の検討　159
5-6-1　HaloTag-H2B を発現させた細胞内での acriflavine の局在　159
5-6-2　Acriflavine 光触媒による H2B を解析対象とした iPPL 法の検討　161
5-6-3　nanoLC-MS/MS による H2B 相互作用タンパク質の解析　163
5-6-4　従来法（BioID, APEX）と iPPL 法の比較　166
5-7　第五章のまとめ　170
References　171
Experimental section　172

第六章「結論」　183

謝辞

Abbreviations

2D-DIGE	2-D fluorescence difference gel electrophoresis
Abs	absorbance
abs	absorbance
Ac	acethyl
ADC	antibody-drug conjugate
Ala	alanine
AMP	adenosine monophosphate
aq.	aqueous
Ar	aryl
ATP	adenosine triphosphate
APEX	engineered ascorbate peroxidase
APS	ammonium persulfate
ASF	asialofetuin
a. u.	arbitrary unit
BioID	biotin identification
Bn	benzyl
Boc	tertiary-butoxycarobonyl
BPB	bromophenol blue
bpy	2,2'-bipyridyl
br	broad
BRSM	based on recovered starting material
BSA	bovine serum albumin
Bu	buthyl
c	centi-
˚C	degrees celsius
CA	carbonic anhydrase
Calcd	calculated
CAN	ammonium hexanitratocerate (IV)
Cat.	catalyst
CB	cannabinoid receptor
CBB	coomassie brilliant blue
Cbz	carbobenzoxy
CMD	concerted metalation-deprotonation
conc.	Concentration
CuAAC	Cu-catalyzed azide alkyne cycloaddition
CV	cyclic voltammetry
Cy	cyclohexyl
Cys	Cystein
d	doublet
D	debye
δ	chemical shift in parts per million
Δ	heat, delta
DBCO	dibenzocyclooctyne
Dcbpy	4,4'-dicarboxy-2,2'-bypiridyl
DCM	dichloromethane
DFT	density functional theory
DHFR	dihydrofolate reductase
DHP	dihydropyran
DIEA	diisopropylethylamine
DIH	1,3-diiodo-5,5-dimethylhydantoin
DLS	dynamic light scattering
DMA	*N*,*N*-dimethylacetamide
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMF	*N*,*N*-dimethylformamide
DMPU	*N*,*N'*-dimethylpropyleneurea
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dppBz	1,2-Bis(diphenylphosphino)benzene
dppf	1,1'- bis(diphenylphosphanyl) ferrocene
DTB	desthiobiotin
DTT	dithiothreitol
ε	molar absorption coeeficient
EDCI	1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethyl-1-carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMARS	enzyme-mediated activation of the radical source
emis	emission
ESI	electrospray ionization
EWG	electron withdrawing group
dba	dibenzylideneacetone

Et	ethyl
eq.	equivalent
FA	formic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluoresceinisothiocyanate
FKBP	FK506 binding protein
FT	flow through
g	gram(s)
G	Gibbs energy
GO	gene ontology
GFP	green fluorescent protein
Glu	glutamine
GMA	glycidyl methacrylate
GPC	gel permeation chromatography
h	hour(s)
Hal	halide
His	histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromategramphy
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
Hz	hertz
i-	iso
IAA	iodoacetamide
IC_{50}	half inhibiting concentration
IPA	iso-propyl alcohol
IR	infrared
J	coupling constant
L	liter(s)
LC	liquid chromatography
LED	light emitting diode
Lg	ligand
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
Lys	lysine
M	moles per liter
m	meter(s), milli, multiplet
m-	meta
μ	micro
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
MAUra	1-methyl-4-arylurazole
max	maximum
Me	methyl
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MHz	megahertz
min	minute(s)
MLCT	metal to ligand charge transfer
mol	mole(s)
MTX	methotrexate
MS	mass spectrometry
MW	molecular weight
n	nano
N. D.	not detectable
n-	normal
NBS	*N*-bromosuccinimide
NHC	*N*-heterocyclic carbene
NHS	*N*-hydroxy succinimide
NIS	*N*-iodosuccinimide
NISac	*N*-iodosaccharin
NMO	*N*-methylmorpholine *N*-oxide
NMP	*N*-methylpyrroridone
NMR	nuclear magnetic resonance
NPs	nanoparticles
ν	frequency
OVA	ovalbumin
p-	para
pAb	polyclonal antibody
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PDB	protein data bank
PDGFR	platelet-derived growth factor
PEG	polyethylene glycol
PFA	paraformaldehyde
Ph	phenyl

PNA	peanuts agglutinin
POI	protein of interest
PPI	protein-protein interaction
ppm	parts per million
PPTS	pyridinium *p*-toluenesulfonate
Pro	proline
PSMs	peptide spectrum matches
PTAD	4-phenyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione
PTLC	preparative thin layer chromatography
PVDF	polyvinylidene difluoride
Py.	pyridine
q	quartet
quant.	quantitative
R	functional group
λ	wavelength
r.t.	room temperature
RNA	ribonucleic acid
Rt	retention time
RPMI	roswell park memorial institute
s	singlet
SAv	streptavidin
SCE	saturated calomel electrode
SDC	sodium deoxycholate
SDS	sodium dodecyl sulfate
S_EAr	electrophilic aromatic substitution
Ser	serine
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl group
SLS	sodium *N*-lauroyl sarcosinate
SPAAC	strain promoted azide alkyne cycloaddition
SPPLAT	selective proteomic proximity labeling assay using tyramide
S_NAr	nucleophilic aromatic substitution
SOMO	single occupied molecular orbital
TEA	triethylamine
TEM	transmission electron microscope
TFA	trifluoroacetic acid
THPTA	tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
TIC	total ion chromatogram
TMS	trimethylsilyl
TOF	time-of-flight
Trp	tryptophan
TRT	tyrosyl radical trapping agent
Tyr	tyrosine
UV	ultraviolet

発表論文

原著論文

1) "Selective purification and chemical labeling of a target protein on ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads"
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Hiroyuki Nakamura,
Chem. Commun., **2017,** *53,* 4838-4841.

2) "1-Methyl-4-aryl-urazole (MAUra) labels tyrosine in proximity to ruthenium photocatalysts"
Shinichi Sato, Kensuke Hatano, **Michihiko Tsushima**, Hiroyuki Nakamura,
Chem. Commun., **2018,** *54,* 5871-5874.

3) "Catalyst-proximity protein chemical labelling on affinity beads targeting endogenous lectins"
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Tatsuya Niwa, Hideki Taguchi, Hiroyuki Nakamura,
Chem. Commun., **2019,** *55,* 13275-13728.

4) "Target Protein Identification on Photocatalyst-Functionalized Magnetic Affinity Beads"
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Keita Nakane, Hiroyuki Nakamura
Current Protocols, **2020**, *101*, 1.

5) "Intracellular Photocatalytic-Proximity Labeling for Profiling Protein–Protein Interactions in Microenvironments"
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Tatsuya Niwa, Hideki Taguchi, Hiroyuki Nakamura,
Manuscript preparing

総説

1) "Target-protein-selective inactivation and labelling using an oxidative catalyst"
Shinichi Sato, **Michihiko Tsushima**, Hiroyuki Nakamura,
Org. Biomol. Chem. **2018**, *16*, 6168.

2) "タンパク質ケミカルラベリングにおける一電子移動反応の活用"
佐藤伸一、**對馬理彦**、中村浩之、有機合成化学協会誌, 77（特集号 2019 年 5 月号「ラジカル種の利用最前線—合成・物性・理論」）, 463-471 (2019).

参考論文

1) "Development and Application of Catalytic Tyrosine Modification"
Shinichi Sato, **Michihiko Tsushima**, Kousuke Nakamura, Hiroyuki Nakamura,
YAKUGAKU ZASSHI, **2018,** *138,* 39-46.

学会発表

国際会議における発表

1) (ポスター発表、査読無)
"Target-Selective Protein-Modification using Ru(bpy)$_3$ Catalyst Immobilized on Affinity Beads",
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Hiroyuki Nakamura,
10th Workshop on Organic Chemistry for Junior Chemist (WOCJC-10), Hsinchu, Taiwan, January **2017**

2) (ポスター発表、査読無)
"Catalystic Labeling of Ligand-Binding Proteins on Ruthenium Photocatalyst-Functionalized Affinity Beads"
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Hiroyuki Nakamura,
International CLS Forum 2018, Tokyo, March **2018**

3) (ポスター発表、査読無)
"SELECTIVE PURIFICATION AND LABELING OF LIGAND-BINDING PROTEINS ON RUTHENIUM PHOTOCATALYST FUNCTIONALIZED AFFINITY BEADS",
Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Hiroyuki Nakamura,
International Chemical Biology Society 7th Annual Conference, September **2018**.

国内学会における発表

1) (ポスター発表、査読無)
○**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「ビーズ固相表面における一電子酸化的なタンパク質修飾法の開発」
日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、P-011、京都、**2016 年** 6 月

2) (口頭発表、査読無)
○**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「アフィニティービーズ上における標的選択的なタンパク質機能化法の開発」
日本化学会第 97 回年会、2C8-45、東京、**2017 年** 3 月

3) (口頭発表、査読無)
○**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「Ru 光触媒固定化アフィニティービーズを用いた標的選択的なタンパク質修飾法の開発」
第 73 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、B03、東京、**2017 年** 5 月

4) (ポスター発表、査読無)
○**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「タンパク質の精製と機能化を同時に可能とする Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズの開発」
日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、P-113、北海道、**2017 年** 6 月

5) (口頭発表、査読無)
○**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズ上での標的タンパク質選択的ラベル化」
日本化学会第 98 回年会、2D3-47、千葉、**2018 年** 3 月

6) (口頭発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズを用いたリガンド結合タンパク質の網羅的ラベル化」
日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、O-19、東京、**2018 年** 6 月

7) (ポスター発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「光触媒を担持したアフィニティービーズ上におけるタンパク質ラベル化」
第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2P-017、大阪、**2018 年** 9 月

8) (口頭発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「Proximity-dependent labeling on ruthenium photocatalyst- functionalized affinity beads」
日本化学会第 99 回年会、2F6-31、兵庫、**2019 年** 3 月

9) (口頭発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「Ru 光触媒の近傍で起こる一電子移動反応を利用した標的タンパク質のケミカルラベリング」
第 115 回有機合成シンポジウム、A-4、宮城、**2019 年** 6 月

10) (ポスター発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「タンパク質の精製と機能化を同時に可能とする Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズの開発」
日本ケミカルバイオロジー学会第 14 回年会、P-130、名古屋、**2019 年** 6 月

11) (ポスター発表、査読無)
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「標的タンパク質の部位選択的ラベル化を志向した光触媒担持ビーズ上での近接ラベル化法の開発」
第 9 回 CSJ 化学フェスタ 2019、P3-066、東京、**2019 年** 10 月

12) （口頭発表、査読無）
〇**對馬理彦**、佐藤伸一、中村浩之
「タンパク質-タンパク質相互作用の解析を志向した細胞内触媒近接ラベル化の開発」
第 64 回日本薬学会関東支部大会、C-07、オンライン開催、**2020 年** 9 月

13) （口頭発表、査読無）
〇**對馬理彦**、Wen Yijin、津賀雄輝、金森功吏、湯浅英哉、中村浩之
「リガンド連結型有機光触媒を用いた標的タンパク質の酸化的不活性化と抗腫瘍活性」
LASER WEEK IN KOCHI 2020, オンライン開催、**2020 年** 10 月

その他（受賞歴）

1) ポスター賞、 日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、2016 年 6 月
2) Outstanding Student Award, 10th Workshop on Organic Chemistry for Junior Chemist (WOCJC-10), January 2017
3) 優秀ポスター賞、第 9 回 CSJ 化学フェスタ 2019、2019 年 10 月
4) 若手アワード、LASER WEEK IN KOCHI、2020 年 10 月

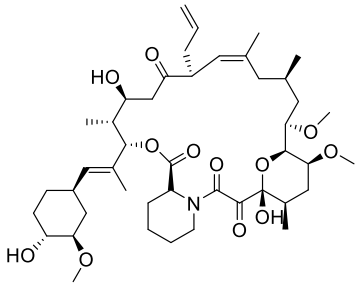
第一章

序論

1-1. ケミカルバイオロジー

ケミカルバイオロジーとは天然物化学、有機合成化学や分子生物学を基盤とし、生命現象の分子レベルでの解明を目指す学問である。具体的に、このケミカルバイオロジーの研究テーマは「バイオイメージング」と「分子標的同定」が大きな流れの研究トピックスとして挙げることができる。「バイオイメージング」は、2008 年にノーベル賞を受賞した緑色蛍光タンパク質（GFP）[1] をはじめとした蛍光タンパク質や蛍光低分子などを活用し、特定の生体分子およびタンパク質の動態や相互作用を可視化することを目的とした研究である [2]。「分子標的同定」は、後述するアフィニティークロマトグラフィーや光親和性標識、タンパク質ケミカルラベリングといった手法を活用し、ある生物活性分子が作用するタンパク質を同定することを目的としたものである [3]。

ケミカルバイオロジーという研究分野は、「分子標的同定」の研究である Stuart L. Schreiber らによる免疫抑制剤 FK506（tacrolimus）を用いた T 細胞のシグナル伝達経路の作用機構解明を契機に拡がった（Figure 1-1）[4]。Schreiber らは免疫抑制剤 FK506（タクロリムス）の全合成を達成しており [5]、合成した FK506 をリガンドとし後述するアフィニティーカラムを作製、このカラムを用いて FK506 の標的タンパク質を同定している。これにとどまらず、FK506 と FKBP が結合した複合体がカルシニューリン（PPB2）を阻害することで、FK506 が免疫抑制活性を示すという作用機序も明らかにした。これらの研究のように、天然物化学・有機合成化学の技術を利用して生命現象を解明しようという試みは近年盛んに研究がなされている。



FK506 (tacrolimus)

Figure 1-1. FK506 の構造

1-2. アフィニティークロマトグラフィー

ケミカルバイオロジーの研究トピックスである分子標的同定には大きく分けて以下の2つがある。

① アフィニティークロマトグラフィーによってリガンド結合タンパク質を精製する手法
② アフィニティーラベリングによってリガンド-タンパク質相互作用を共有結合性の検出基によって検出・同定する手法

1-2節および1-3節ではアフィニティークロマトグラフィーとアフィニティーラベリングについて詳細を述べる。

1-2-1. アフィニティークロマトグラフィーの原理

タンパク質の多くは、生体内で特定の生体分子もしくは生物活性分子と相互作用し機能している。中でも低分子化合物に相互作用し、機能が変化するタンパク質は創薬標的となりえるため、ケミカルバイオロジー研究において注目を集める。例えばグルコーストランスポーターはその輸送相手であるグルコースと、卵白中に含まれるタンパク質であるアビジンはビオチンと、特異的に相互作用することが知られている。ここで述べたグルコースやビオチンのようにタンパク質と特異的に相互作用する低分子のことをリガンドと呼ぶ。リガンドと標的タンパク質の特異的な相互作用を利用し、リガンドを担持した固相担体を用いて標的タンパク質を精製する技術がアフィニティークロマトグラフィーである[6]。

アフィニティークロマトグラフィーでは、アガロースやセルロースなどの固相担体（ビーズ）に対してリガンドを共有結合で連結する。このリガンドが担持された固相をアフィニティービーズと呼ぶ。アフィニティービーズを細胞破砕液のようなタンパク質混在系に添加するとアフィニティービーズ上のリガンドに対して標的タンパク質が相互作用する。しかし、リガンドと相互作用しないタンパク質は液相中に残存するため、アフィニティービーズと液相を分離することによって標的タンパク質を精製するという原理である（Figure 1-2）。

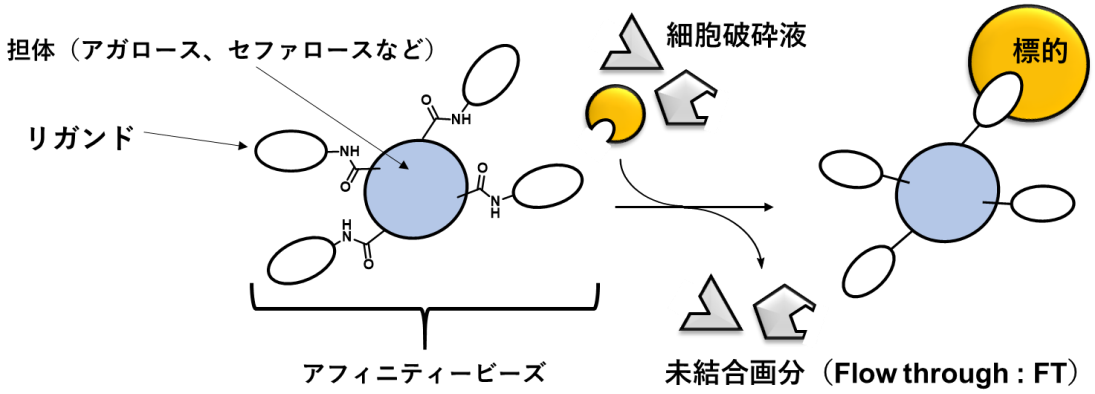


Figure 1-2. アフィニティークロマトグラフィーの概要

アフィニティークロマトグラフィーはタンパク質精製の用途に用いられるカラム法と、分子標的同定の用途に特化したバッチ法の二通りの手法がある（Figure 1-3）。カラム法ではカラム管をアフィニティービーズで満たし、タンパク質溶液をカラムに通すことでタンパク質の精製を行う。バッチ法では少量のアフィニティービーズをチューブに加えタンパク質溶液を添加する。この溶液中から

遠心操作などでアフィニティービーズと上清を分離しビーズを洗浄することで標的タンパク質を精製する。詳細は後述するが、分子標的同定が目的の場合、電気泳動や質量分析による解析などを行うため、多量のタンパク質を必要としないことや、リガンドが希少であることも多いため、小スケールでの精製で十分である。そのため、分子標的同定の用途ではバッチ法が使われることが多い。本論文で用いる場合もバッチ法を用いている。

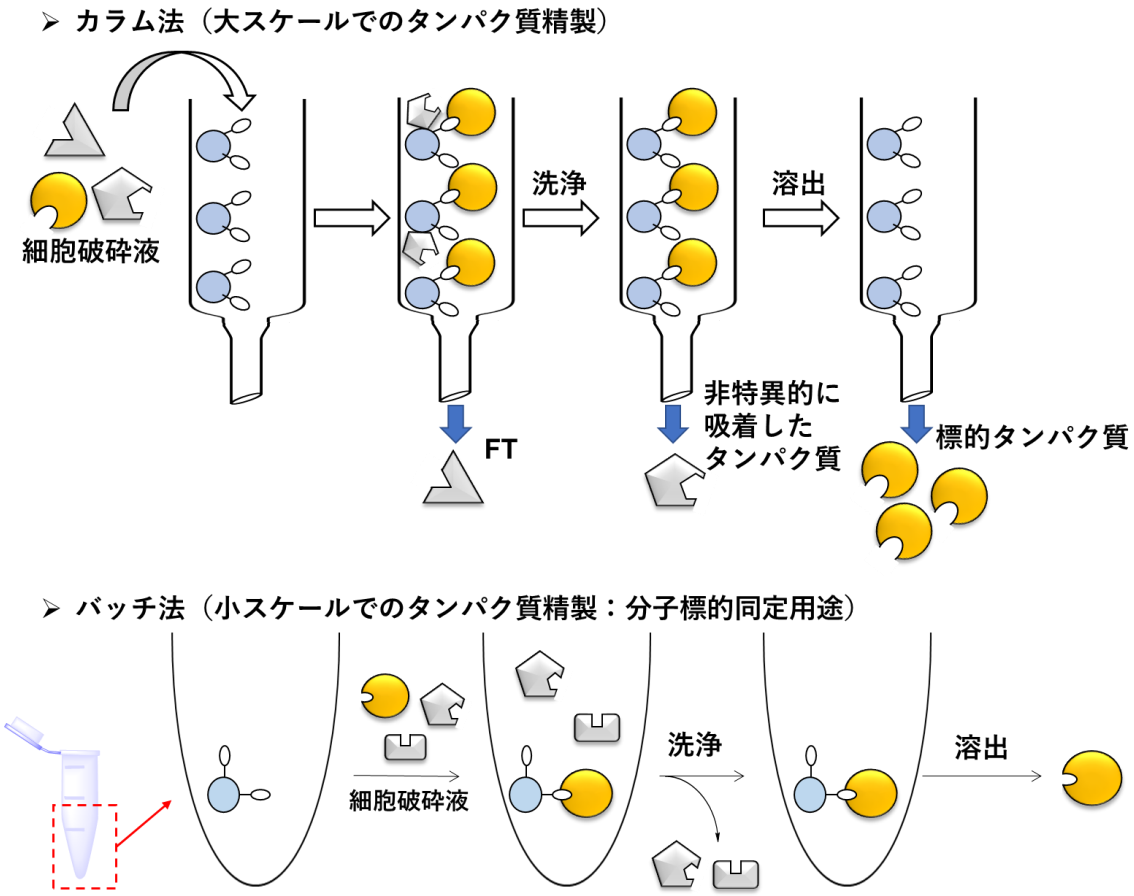


Figure 1-3. アフィニティークロマトグラフィーのカラム法・バッチ法

1-2-2. アフィニティークロマトグラフィーを用いたリガンド結合タンパク質の同定法

ある生物活性分子の標的タンパク質を同定するという分子標的同定の用途で用いる場合、アフィニティービーズ上にリガンドとして標的未知な分子をリガンドとして担持する。このアフィニティービーズを用いてタンパク質混在系から精製したタンパク質を SDS-PAGE によって分離する。分離したタンパク質のバンド部分を切り取り、ゲル内のタンパク質をトリプシンやキモトリプシン、Glu-C、Lys-C といった特定のアミノ酸残基で加水分解する酵素を用いてペプチド断片化する。一般的には、塩基性アミノ酸残基（リジン、アルギニン）の C 末端側でペプチド結合を切断する酵素であるトリプシンが最初の選択肢として用いられる。得られたペプチド消化断片を MS/MS 解析し、どのタンパク質由来のペプチド断片であるかデータベースと照合することによって標的タンパク質を同定することができる（Figure 1-4）[3]。しかし、後述するように、リガンドへの相互作用タンパク質だけでなく、固相担体やリンカー構造に非特異的に吸着するタンパク質も同時に溶出されるため、そのような非特異的吸着性のタンパク質とリガンドと相互作用する標的を判別する必要がある。リガンドと相互作用しているタンパク質と非特異的に吸着しているタンパク質は競合阻害実験を行うこと

によって区別することができる。競合阻害実験では、過剰量のリガンドを添加することによってビーズ上からリガンドの相互作用タンパク質を遊離させる。これによって消失したバンドはリガンドに結合したタンパク質であると判断することができる。

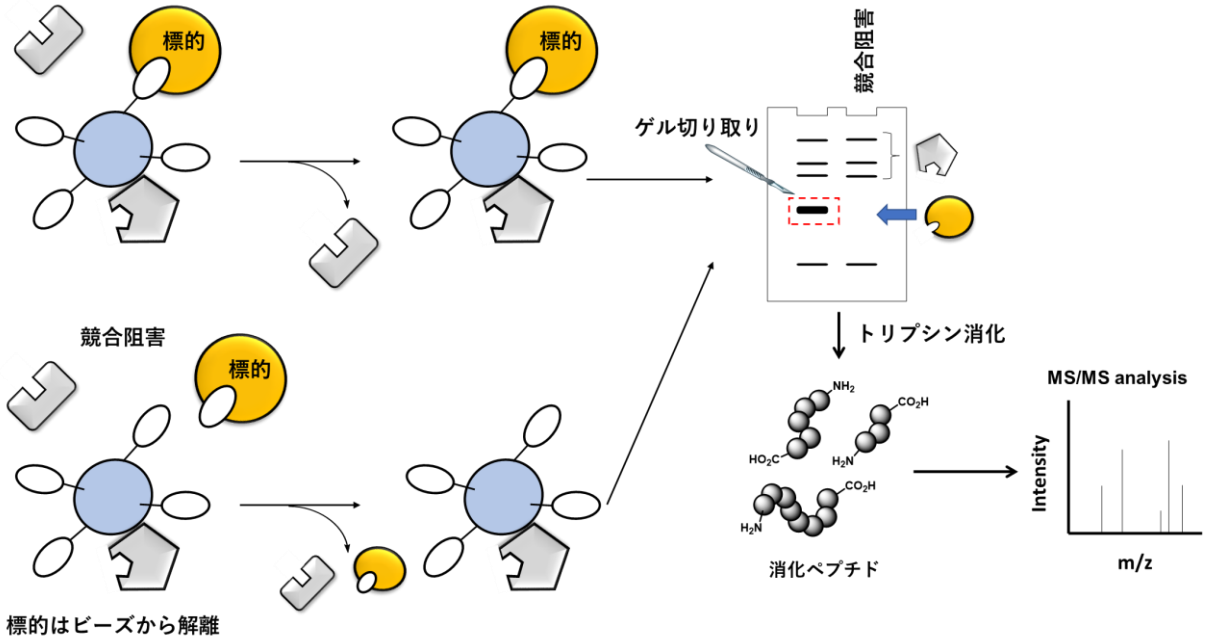


Figure 1-4. アフィニティークロマトグラフィーによるリガンド結合タンパク質同定

生物活性分子をリガンドとしてアフィニティークロマトグラフィーを行うことで、その標的を同定した例は多くあり、1-1 節で述べた FK506 の結合タンパク質や、大きな薬害を引き起こしたサリドマイドの薬害原因タンパク質もアフィニティークロマトグラフィーによって同定されている [7]。

1-2-3. 従来までのアフィニティークロマトグラフィーの問題点

2000 年代までのアフィニティークロマトグラフィーに用いられていた固相担体はアガロースビーズやセファロースビーズなどといった、親水性で膨潤性の粒径数百μm 程度の多孔性ビーズが一般的であった。しかし、これらの固相担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーの問題点として以下の 5 点が挙げられる。

1) 一般的に固相担体に固定化できるリガンドの量が少なく、標的タンパク質がリガンドに結合できる頻度が少ない

2) タンパク質混在系から標的タンパク質を精製する際、固相担体のもつ網目構造に標的以外のタンパク質を吸着する

3) リガンド担持の際、アガロースやセファロースの反応性の乏しい水酸基を結合性の官能基に変換するため、有害物質である臭化シアンなどで前処理を行う必要がある

4) 結合解離定数 $K_d > 1$ μM のリガンドとの結合力が弱いタンパク質はビーズの洗浄過程で解離してしまうため精製することが困難である

5) 精製したタンパク質の検出法として汎用される銀染色法は検出限界が数 ng 程度であり、微量の結合タンパク質の解析をしばしば困難にする

近年用いられるアフィニティークロマトグラフィーでは、後述の技術によって、上記の(1)~(3) については解決されてきているが、現在でも（4）および（5）はアフィニティークロマトグラフィーの課題となっている。

1-2-4. ナノアフィニティービーズ

近年では、合成高分子を担体としたナノサイズのアフィニティービーズが開発されている。半田らは 2000 年にラテックス粒子の表面がグリシジルメタクリレート（GMA）で覆われた構造をもつナノアフィニティービーズである SG ビーズ [8]、2008 年に GMA の中心にフェライト粒子を内包した構造を持つナノアフィニティービーズである FG ビーズ [9] を開発している（Figure 1-5）。粒径が 200 nm と小さいため、比表面積が広く、従来のアフィニティービーズよりも多くのリガンドが担持でき、表面を覆うポリマー構造はタンパク質を吸着しにくい。さらに GMA のエポキシドを足掛かりとして直接リガンドを導入することもできれば、続くアミン修飾、カルボン酸修飾などによって種々の表面修飾ビーズが作製可能であるため、有害な試薬を使うことなく容易にリガンドを担持できる。さらに、FG ビーズではフェライト粒子を内包しているため磁気による回収が可能である。一般的に遠心操作でアフィニティービーズを回収すると、一緒に沈殿するタンパク質の不溶性画分も回収してしまうため標的タンパク質の純度低下に繋がることが知られている。磁気による回収ができるということは、不溶性画分と分離することが可能となるため（重量による垂直方向への分離ではなく、磁気による水平方向への分離が可能となり不溶性画分と分離できる）、標的タンパク質の純度向上につなげることができる。

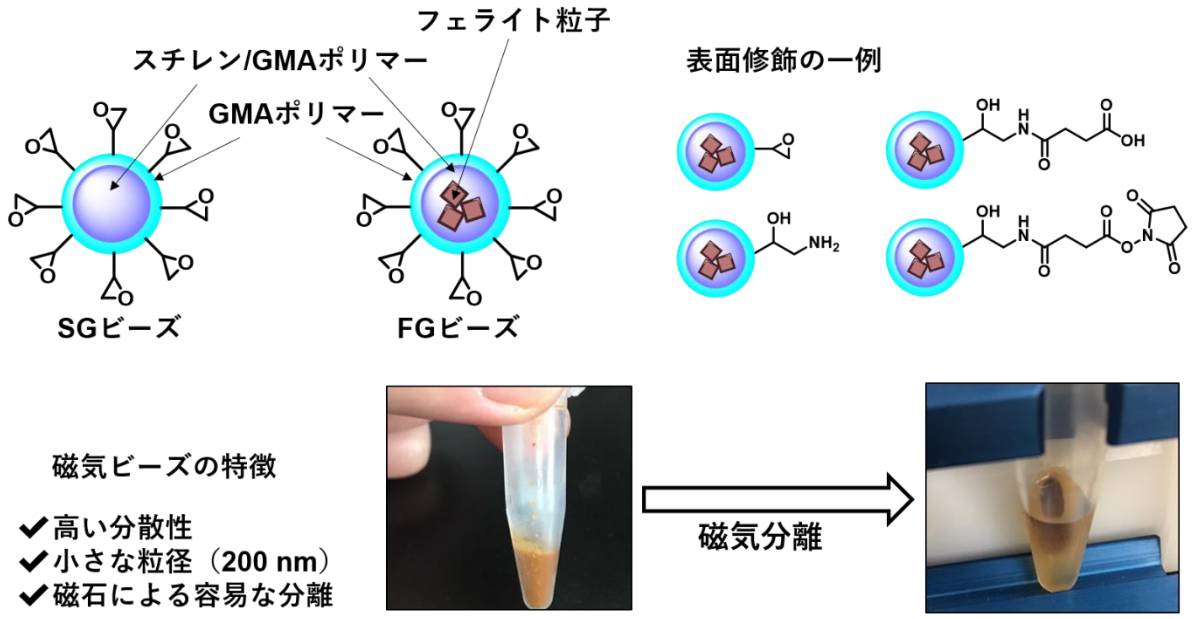


Figure 1-5. ナノアフィニティービーズの構造

1-3. アフィニティーラベリング（親和性標識法）

1-2-3 節で述べたように、アフィニティークロマトグラフィーではリガンドとの相互作用の弱いタンパク質が困難である。アフィニティークロマトグラフィーでは検出できないタンパク質を検出可能とする手法としてアフィニティーラベリングがある。この方法は可逆なリガンド-タンパク質相互作用を不可逆な共有結合によって捕捉するため弱いリガンド-タンパク質相互作用も検出が可能である。この手法はタンパク質ラベル化技術を基盤としているため、タンパク質ラベル化の概要を述べたのちに、アフィニティーラベリングの詳細を述べる。

1-3-1. タンパク質ケミカルラベリング

タンパク質ケミカルラベリング（タンパク質化学修飾）とは、タンパク質のアミノ酸残基を反応点として任意の低分子を導入する手法である [10]。すなわち、通常の有機合成では低分子と低分子で反応を行うところを、タンパク質ケミカルラベリングでは低分子とタンパク質で反応を行う。通常の有機合成とは異なり、タンパク質に対する反応であるため、水溶媒中、中性条件、0 - 37 °C の温度条件下という温和な条件が求められる。天然にはアミノ酸残基は 20 種類存在するが、リジン残基（Lys）やシステイン残基（Cys）といった求核性アミノ酸残基に対する求電子的ラベル化反応が広く用いられている。具体的には、システイン残基では、チオールの高い求核性を利用したマレイミドとの Michael 付加反応やα-ハロケトンへの求核付加反応、ジスルフィド交換反応による修飾反応が汎用されている。リジン残基では *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHS エステル）との縮合反応やアルデヒドとの還元的アミノ化、イソシアネートやチオイソシアネートへの求核付加反応が汎用されている（Figure 1-6）。Lys 残基や Cys 残基のラベル化にとどまらず、チロシン残基 [11]、トリプトファン残基 [12]、ヒスチジン残基 [13]、メチオニン残基 [14]、タンパク質の C 末端 [15] や N 末端 [16] のラベル化法も近年開発されている。

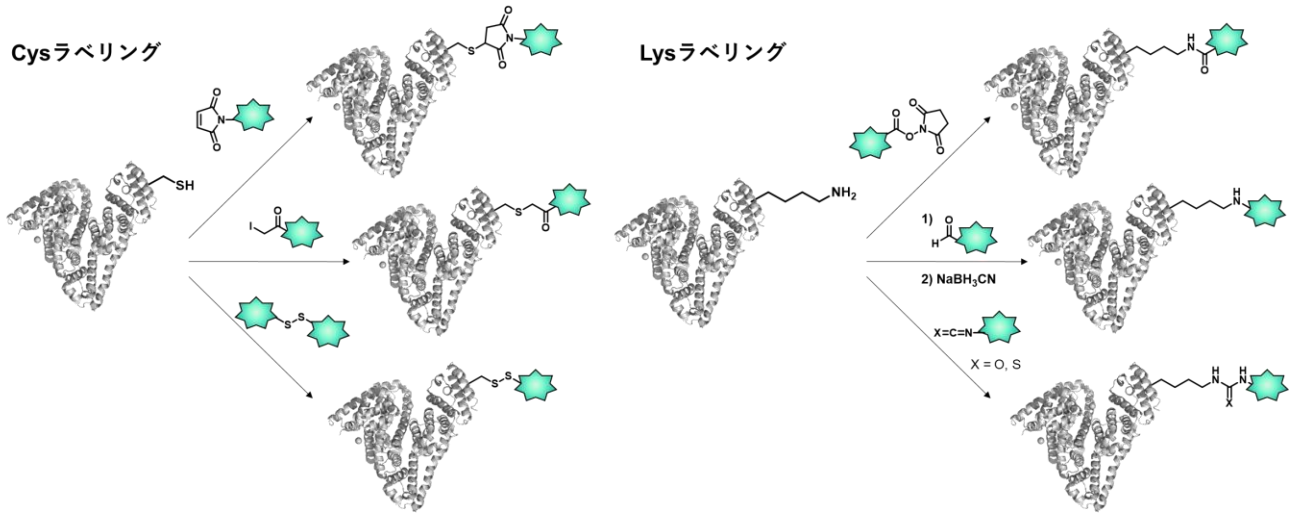


Figure 1-6. タンパク質ケミカルラベリングの一例

1-3-2. アフィニティーラベリングの原理

アフィニティーラベリングでは、リガンド、反応基および蛍光分子やビオチンといった検出基を連結した分子を用いることで、リガンド結合タンパク質に対して共有結合形成を行い、リガンド結合タンパク質を選択的にラベル化する手法である（Figure 1-7）。

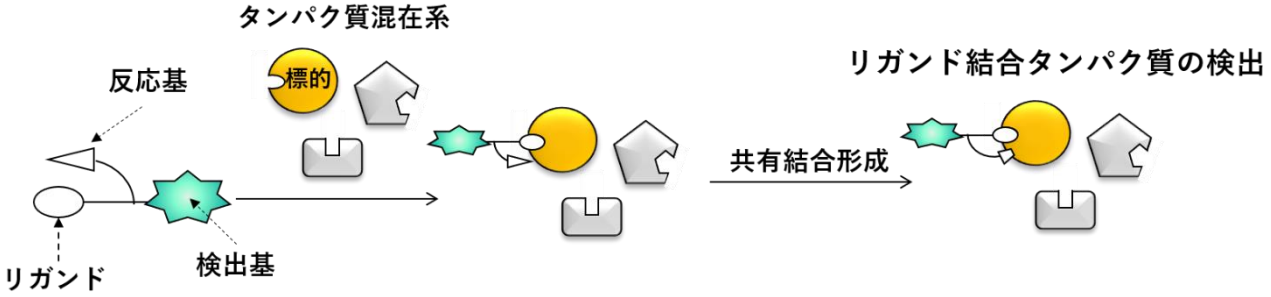


Figure 1-7. アフィニティーラベリングの概要

前節ではタンパク質ケミカルラベリングの手法をいくつか紹介したが、これらの方法は精製タンパク質のラベル化に特化している場合が多く、アフィニティーラベリングの際にはまた異なるアプローチで反応設計をする必要がある。アフィニティーラベリングはリガンドと相互作用をするタンパク質を選択的にラベル化することが何よりも重要である。例えば、反応基に NHS エステルや α-ヨードケトンを選定すれば、リガンドが標的タンパク質相互作用する前に標的以外のタンパク質と共有結合形成を行う。そのため、アフィニティーラベリングを行う際には、リガンドが標的タンパク質と相互作用し、反応基が標的タンパク質に近接した場合にのみ反応するような反応設計が必要である。そのための分子設計の一つとして、反応基にあえて反応性の低いものを選択するというものがある（Figure 1-8）。具体的には、α-ヨードケトンの代わりに α-クロロケトンを用いる、スルホニルクロリドに代わりにスルホニルフルオリドを用いるといった設計である。通常、溶液中のタンパク質とほとんど反応しないような低反応性の反応基であっても、リガンドと相互作用した場合には反応基とアミノ酸残基が接近するため、反応が進行しやすくなる（近接効果）。

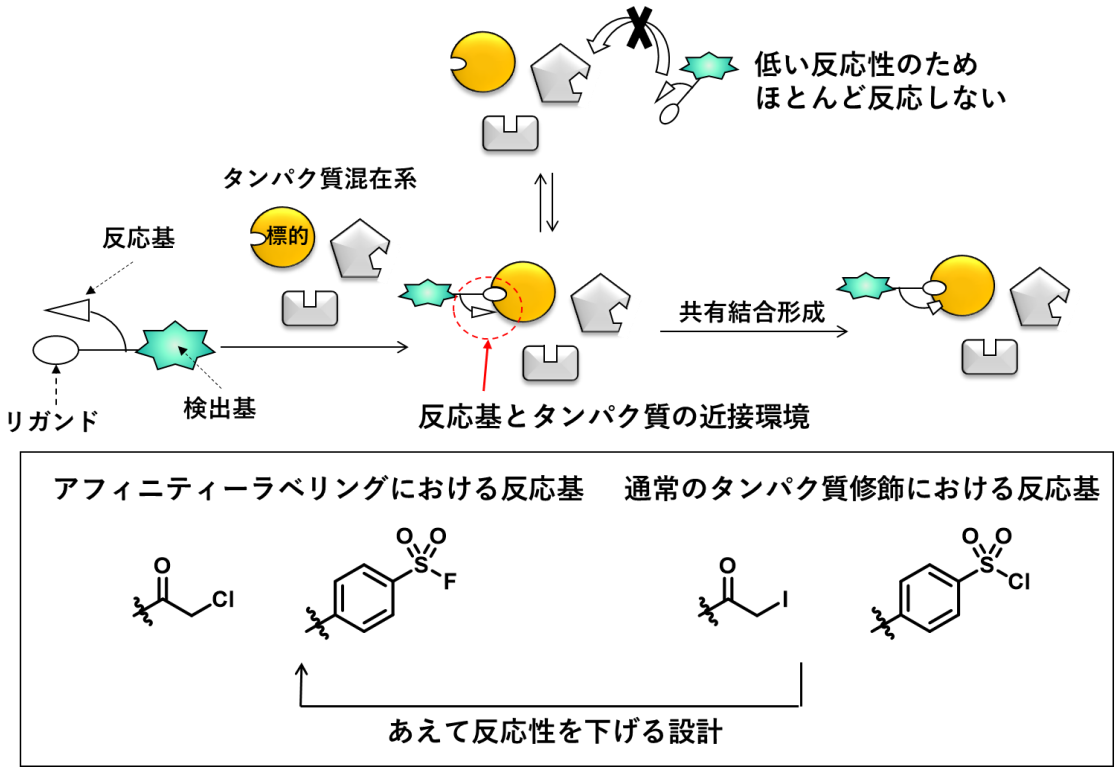


Figure 1-8. アフィニティーラベリングにおける分子設計

実際に、アフィニティーラベリングを用いてキナーゼ阻害剤に結合するキナーゼや off target の ATP 結合タンパク質を解析する手法が報告されている [17]。この手法は不可逆な共有結合を介したリガンド結合タンパク質の検出法であるため、相互作用の弱いタンパク質に対しても適用が可能である。

1-3-3. 光親和性標識法

前節でアフィニティーラベリングの分子設計において、リガンドと相互作用していない際のリガンド非依存的なラベル化反応を抑えることが重要であることを述べた。前節で紹介した方法は反応基自身の反応性で制御するものであるが、光を用いて反応基の反応性を制御する光親和性標識法がアフィニティーラベリングでの分子標的同定に広く用いられている [18]。光親和性標識法とは、光によって反応性活性種を生じる構造（光親和性標識基）および検出基をリガンドに導入した光親和性標識プローブを用いる。光親和性標識基には UV 照射によってビラジカルを生じるベンゾフェノンやナイトレンを生じるアリールアジド、カルベンを生じるジアジリンなど、高反応性活性種を生じる構造が用いられる（Figure 1-9）。この高反応性活性種がタンパク質中の N-H 結合、O-H 結合、S-H 結合や C-H 結合と反応し、共有結合を形成する。このプローブを用いてアフィニティーラベリングと同様の原理でリガンド結合タンパク質をラベル化する方法である。タンパク質混在系中に光親和性プローブを添加し、リガンド-タンパク質相互作用の平衡が定常状態になった際に光照射を行なえば、リガンド結合タンパク質が高反応性活性種によりラベル化される。さらに、光親和性標識法で使用される高反応性活性種は、その高い反応性のため反応系中の水分子によって失活するため、タンパク質と相互作用していない状態のリガンドは非特異的なラベル化をおこさないと期待される。

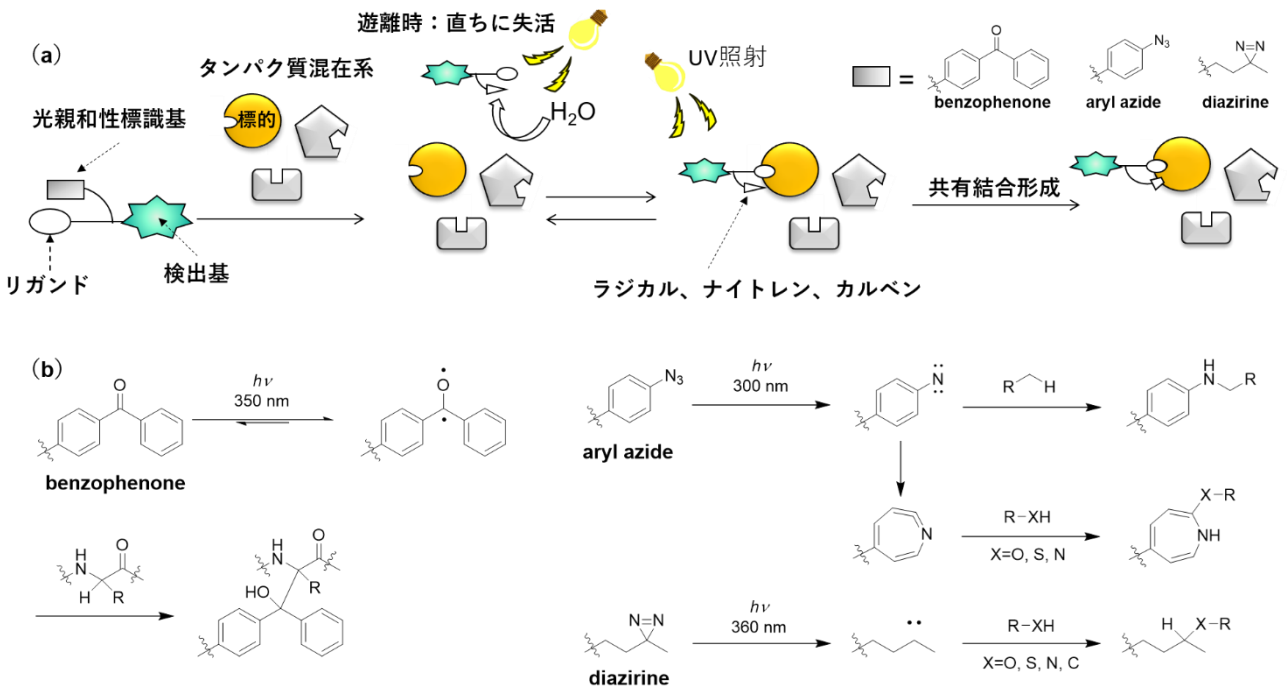


Figure 1-9. 光親和性標識法の原理 (a) 光親和性標識法でリガンド結合タンパク質をラベル化するスキーム (b) 汎用される光親和性標識基の構造と反応機構

光親和性標識法はリガンドとの結合力が弱くても、タンパク質に共有結合による不可逆的な結合を形成すれば結合タンパク質を追跡・同定することができるため、アフィニティークロマトグラフィーよりも幅広い種類のタンパク質に適用することができる。実際に、リガンドとの結合力が弱いタンパク質として知られているレクチンの検出への応用例が報告されている [19]。また、細胞破砕液中でラベル化されるタンパク質と生細胞中での反応でラベル化を受けるタンパク質が異なるという報告がある [20]。このことから、アフィニティークロマトグラフィーと異なり、細胞を破砕することなく生細胞に対してラベル化反応を実施できる点も光親和性標識法の大きな利点である。

1-3-4. アフィニティーラベリングを用いたリガンド結合タンパク質の同定

前節で述べた光親和性標識法を含むアフィニティーラベリングを用いる場合、SDS-PAGE 後の蛍光検出などによってリガンド結合タンパク質を検出することは容易である。しかしながら、ラベル化を実施したのみでは依然としてラベル化タンパク質はタンパク質混在系中に存在するため、アフィニティークロマトグラフィーのように直接ゲル内トリプシン消化を行うことは困難である。実際に MS/MS 解析によるタンパク質の同定を行うためには、ラベル化タンパク質を精製する必要がある。ラベル化を用いれば任意のタグ分子をタンパク質上に導入できるため、このタグ分子を利用してラベル化タンパク質を精製する手法が用いられる（Figure 1-10）。具体的にはビオチン含有プローブでタンパク質をラベル化し、アビジンビーズを用いてラベル化タンパク質を精製する。その結合解離定数はおよそ $K_d = 10^{-15}$ M^{-1} と非常に強く、1 千兆分子のビオチン-アビジン複合体のうち解離しているものは 1 分子のみという計算になる。このビオチン-アビジンの結合を利用すれば洗浄操作によるロスをほとんどなく、標識化したタンパク質を回収することが可能となる。アビジンビーズを介して精製したタンパク質をトリプシン消化し、LC-MS/MS 解析を行うことでラベル化されたリガ

ンド結合タンパク質をラベル化することが可能である[21]。トリプシン消化の際にはアビジンビーズ上に捕捉されたタンパク質をそのままトリプシン消化する方法（on beads digestion）およびビーズ上から溶出してから消化を行う二通りの方法がある。前者の場合にはラベル化を受けたペプチド断片は検出できないものの、ラベル化されていないペプチド断片からタンパク質を同定することが可能である。後者の場合、ラベル化を受けたペプチド断片も検出することが可能であるがビオチン-アビジン相互作用が強力であるため溶出がしばしば困難となる。そのため、ビオチンよりも約 1000 倍相互作用の弱いリガンドであるデスチオビオチンも用いられる。相互作用力がビオチンよりも弱いことから、過剰量のビオチンを添加した競合阻害条件下でデスチオビオチンラベル化タンパク質を溶出することが可能である。

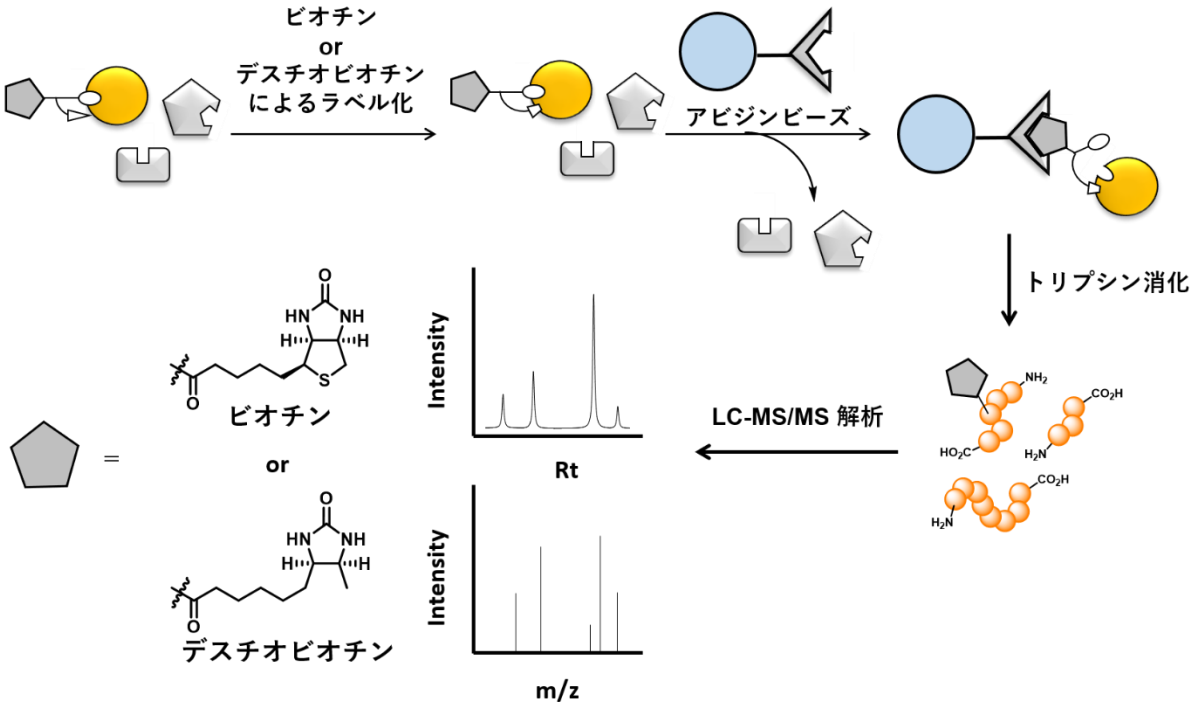


Figure 1-10. アフィニティーラベリングにおけるリガンド結合タンパク質同定

1-3-5. アフィニティーラベリングの問題点

前節で述べたとおり、アフィニティーラベリングは生細胞に適用でき、リガンドータンパク質の結合力によらずリガンド結合タンパク質をラベル化できる点で優れているが、以下に挙げるような問題点がある。

Table 1-1. アフィニティーラベリングの特徴

	近接効果を利用した アフィニティーラベリング	光親和性標識法
1. 分子設計の容易さ	×	×
2. ラベル化効率	◯[a]	△
3. ラベル化できる アミノ酸残基	求核性アミノ酸残基 Ser, Cys, Lys など[b]	種々のアミノ酸の α-水素（C-H 結合） N-H 結合、O-H 結合

[a] タンパク質ポケット付近の求核性アミノ酸残基が反応基と近接する分子設計を行った場合。リンカー長のミスマッチなどがあり、反応基とアミノ酸残基が離れる場合はほとんど反応しない。
[b] タンパク質ポケット内部もしくは近傍に存在する求核性アミノ酸残基に限定

1 については、あるリガンドについて、相互作用タンパク質を解析する際に多種のリンカー、光親和性標識基を検討し最適なプローブ構造を探索する必要がある。タンパク質によってリガンドポケットの深さ、構造が異なるため、プローブ構造は一般化が困難である。このことから未知の相互作用タンパク質や未知の結合様式の解明を目的としたアフィニティーラベリング・光親和性標識では高い効率でのラベル化がしばしば困難である。さらに 2 については、光親和性標識基から生じる活性種の反応性の高さが原因で、容易に水溶媒での分解やプローブ内での分子内反応を引き起こすためタンパク質への反応効率は高くない。近接効果を用いる場合も、高効率なラベル化のためには反応基とリガンドポケット付近の求核性アミノ酸残基との近接環境が必須である。3 に示すように、光親和性標識法においてはあらゆるアミノ酸残基と反応しうるため、接近したタンパク質と反応を起こしやすいが、近接効果を用いたアプローチではプローブの反応基が Ser や Cys、Lys といった限定されたアミノ酸残基との反応を必要とする。このため近接効果を用いる場合には、例えばスルホニルフルオリドを芳香環の *o*, *m*, *p* 位のいずれに配置するかというプローブの設計のわずかな違いでラベル化されるタンパク質が変化することも報告されている [17b]。以上のことから、分子設計が標的タンパク質のポケット構造とマッチする場合には威力を発揮するものの、未知の標的のラベル化を目的とした場合、その同定は容易なものではない。

1-4. リガンド指向性化学によるリガンド結合タンパク質ラベル化法

近年、前節で述べたアフィニティーラベリングと類似のアプローチとしてリガンド指向性化学によるリガンド結合タンパク質ラベル化法が開発されてきている。リガンド指向性化学では標的タンパク質と相互作用するリガンドと、検出基となるプローブ、両者をつなぐ反応基の 3 つの部分で構成されたプローブを用いる。リガンドを介して反応基と求核性アミノ酸残基が近接することで標的タンパク質を機能化する（Figure 1-11）。

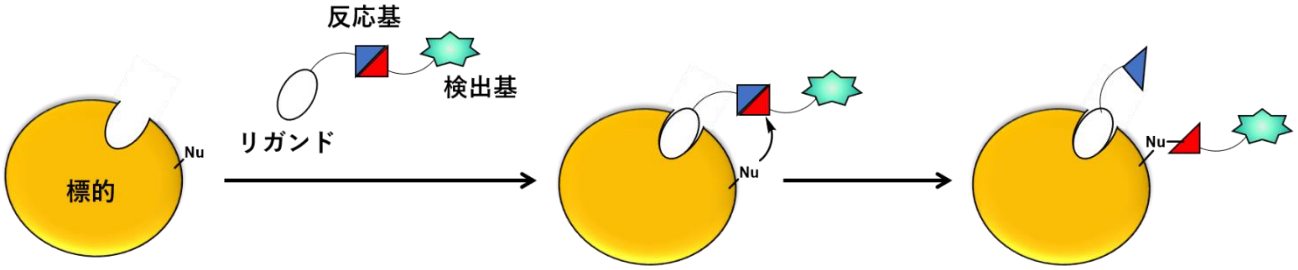


Figure 1-11. リガンド指向性化学による標的タンパク質のラベル化方法

アフィニティーラベリングは標的選択的にラベル化できる手法であるが、ラベル化反応を行った後にはリガンドがタンパク質に共有結合を介して結合したままとなる。すなわち、ラベル化後はタンパク質のリガンド結合ポケットが塞がった状態にあるので、タンパク質の機能は失活している状態にあると言える。反応後にリガンドを切断することができれば、タンパク質からリガンドを遊離させ、タンパク質の機能を損なうことなくラベル化が可能となる。そこで浜地らはリガンドがラベル化反応の脱離基となるような分子設計のもと、リガンド結合タンパク質を選択的にラベル化する手法を開発している。2009 年には、リガンドと検出基のリンカーにトシラート構造を導入し、求核性アミノ酸の求核攻撃によってリガンドが脱離するとともにタンパク質に検出基を導入するリガンド指向性トシル化学（Ligand Directed Tosyl Chemistry: LDT 化学）を報告している（Figure 1-12a）[23]。原理は前述したアフィニティーラベリングと同様であり、リガンドを介してリガンド結合タンパク質と反応基が接近することで標的選択的なラベル化を達成している。本手法では、その反応基がリンカー構造中に存在するトシル基となっているため、反応基への求核攻撃とともに、連結していたリガンドが脱離する。これにより、アフィニティーラベリングのようにタンパク質上にリガンドが連結せず、洗浄処理によってリガンドを除去できるため、タンパク質の機能を損なわずにラベル化タンパク質を得ることが可能となる。また 2012 年にはリガンドと検出基の連結部位にアシルイミダゾールを用い、求核性アミノ酸残基へのアシル化を介して検出基を連結するというリガンド指向性アシルイミダゾール化学（Ligand Directed Acyl Imidazole Chemistry: LDAI 化学）や（Figure 1-12b）[24]、2015 年には連結部位をジブロモフェニルベンゾエートとするリガンド指向性ジブロモフェニルベンゾエート化学（Ligand Directed Dibromophenyl Benzoate chemistry: LDBB 化学）（Figure 1-12c）[25] が報告されている。

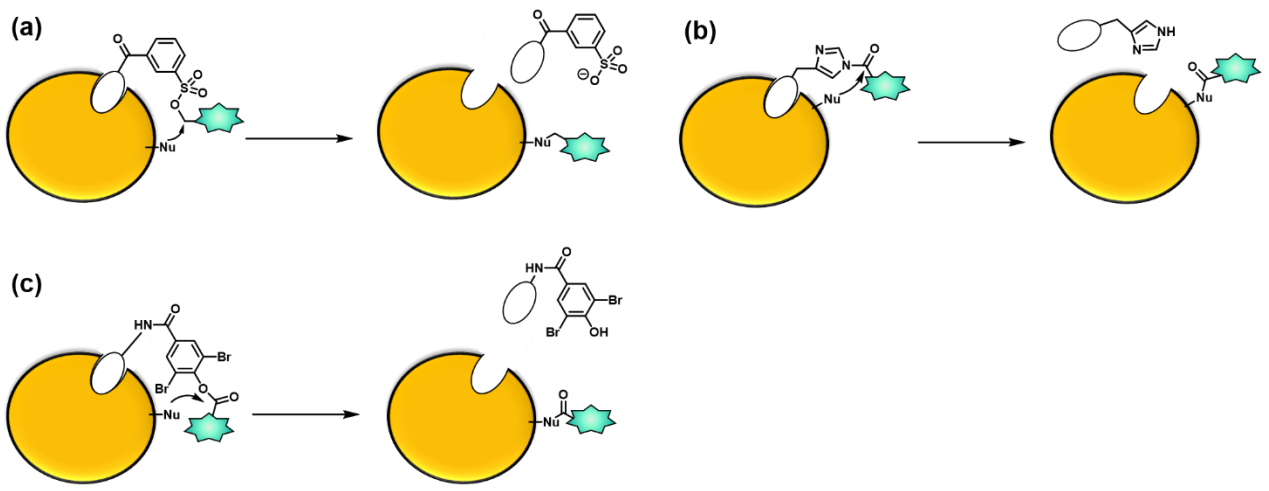


Figure 1-12. リガンド指向性化学による標的タンパク質選択的ラベル化

1-5.リガンド連結型触媒によるリガンド結合タンパク質選択的ラベル化法

前述したアフィニティーラベリングおよびリガンド指向性化学はいずれも光親和性標識法と同様に、反応基と反応点となるアミノ酸残基が衝突しないと反応が進行しないため、綿密な分子設計が必要となる。さらに、タンパク質をラベル化する場合、用途によって精製用のタグの導入、蛍光プローブの導入などタンパク質に付与する機能性分子が異なる。この場合、導入する機能ごとにアフィニティーラベリングやリガンド指向性化学によるラベル化のためのプローブ合成を必要とする。近年ではリガンドに連結させる分子を反応基から触媒へと変更し、導入したい機能分子をラベル化剤として添加するリガンド連結型触媒を用いた戦略も開発されている（Figure 1-13）。触媒的なラベル化の利点として、用いるリガンド連結分子を微量に用いるだけで効率よくラベル化反応が進行する。さらに、リガンド連結型触媒を一度合成すれば導入したい機能ごとの合成を簡略化することができる。

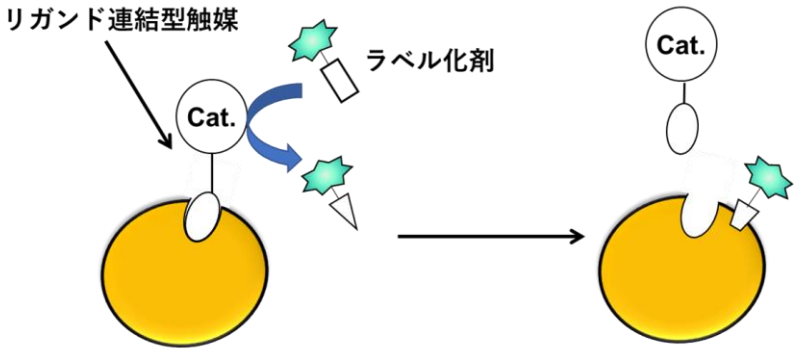


Figure 1-13. リガンド連結型触媒を用いたリガンド結合タンパク質ラベル化

浜地らは2008年に、リガンド指向性化学とはまた異なる手法として「アフィニティー駆動型DMAP化学（affinity-guided DMAP chemistry : AGD 化学）」を報告している[26a]。この手法では、アシル化の有機触媒として汎用されている DMAP とリガンドを連結させた分子を用いる。この DMAP とラベル化剤であるチオエステルが反応することで、標的タンパク質の近傍で反応性の高いアシルピリジニウムを形成する。このアシルピリジニウムが近傍の求核性アミノ酸残基とアシル化反応を起こすことで標的選択的なラベル化が達成される（Figure 1-14a）。この反応では、DMAP の失活が起こらない限り、少量のリガンド連結型触媒で高効率なリガンド結合タンパク質のラベル化が実現可能となる。また、リガンド指向性化学の場合には導入したい機能に応じてプローブをデザインする必要があるのに対し、本手法ではリガンド連結型触媒を一度設計すれば、ラベル化剤の設計はシンプルであるため、様々な機能を標的タンパク質に導入する際にも有効な手法である。また、低分子リガンドを用いたアプローチのみならず、抗体の可変領域のみの構造である scFv に対して DMAP を連結することによって、細胞膜上でのタンパク質ラベル化も実現されている（Figure 1-14b）[26b]。

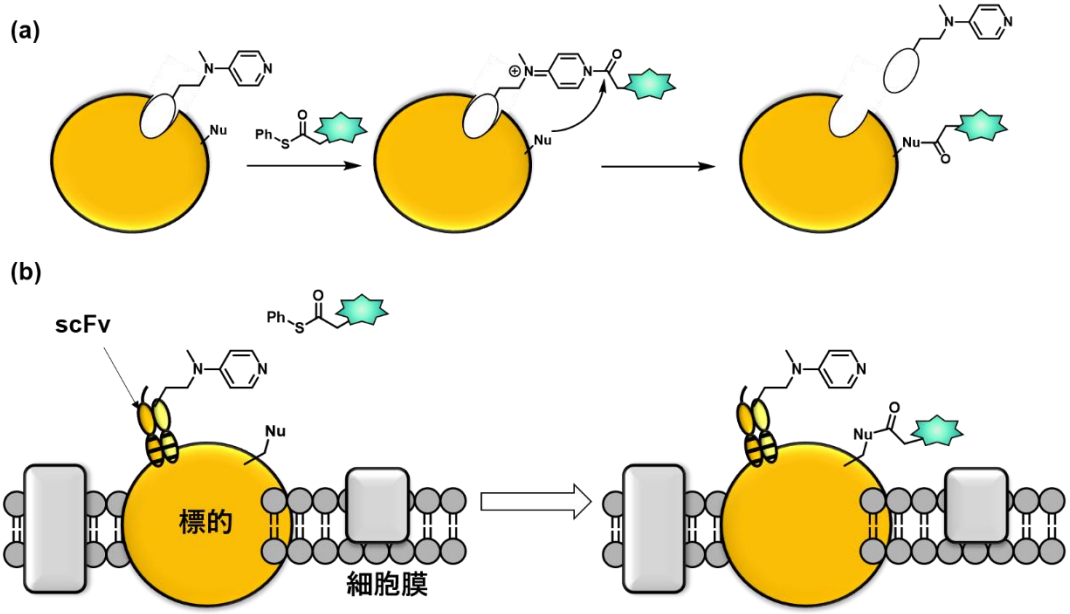


Figure 1-14. AGD 化学によるリガンド結合タンパク質ラベル化 (a) AGD 化学によるリガンド結合タンパク質のラベル化スキーム (b) DMAP 連結 scFv 抗体による細胞膜上の標的タンパク質ラベル化

さらに浜地らは 2017 年に「アフィニティー駆動型オキシム化学（affinity-guided oxime chemistry: AGOX 化学)」を報告している（Figure 1-15）[27]。AGD 化学で用いていた DMAP 触媒よりも求核性の高いピリジニウムオキシムおよびチオエステルよりも求電子性の低い *N*-acyl-*N*-alkylsulfonamide（NASA）を用いることで、非特異的な反応を抑制し、ADG 化学よりも高い選択性でリガンド結合タンパク質のラベル化を達成した。前述した ADG 化学は細胞膜上でのラベル化へと応用されていたが、AGOX 化学では細胞内のリガンド結合タンパク質のラベル化が可能であることも示されている。

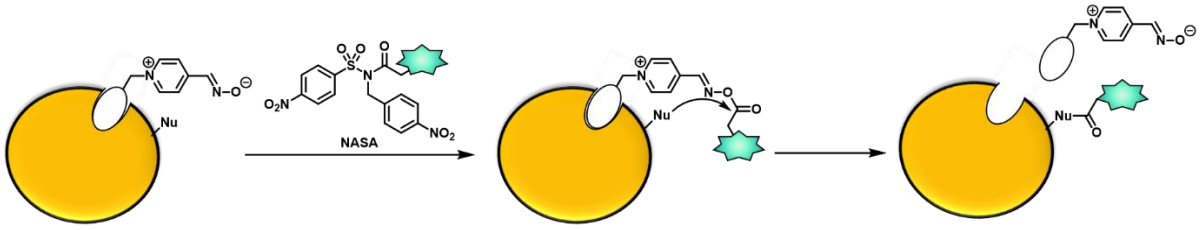


Figure 1-15. AGOX 化学によるリガンド結合タンパク質ラベル化

さらに Ball らは 2011 年に 1-4-2 節で述べた Rh 錯体とジアゾ化合物を用いたトリプトファン残基修飾法を標的タンパク質選択的なラベル化法へと応用している [28]。コイルドコイルと呼ばれるペプチド二量体を利用して Rh 錯体を標的タンパク質に近接させ、この Rh 錯体とジアゾ化合物から生じる反応性の高いカルベノイドを標的タンパク質の近傍で発生させる。この近傍で生じたカルベノイドが標的タンパク質と反応し、標的タンパク質のラベル化が達成される（Figure 1-16）。

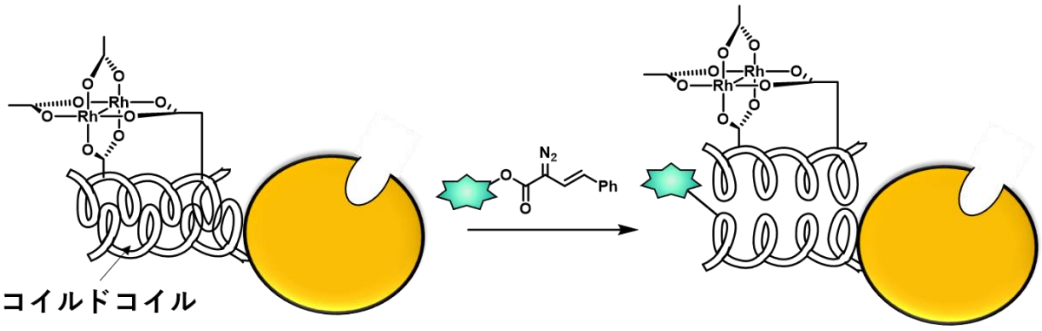
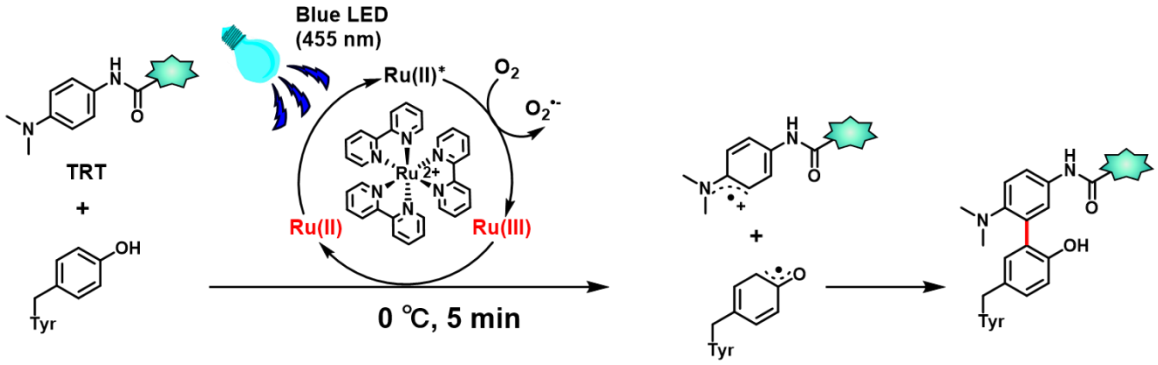


Figure 1-16. Rh 触媒を用いたリガンド結合タンパク質のラベル化

また、当研究室では Ru 光触媒と *N'*-acyl-*N,N*-dimethylphenylenediamine （Tyrosyl Radical Trapping reagent : TRT）をラベル化剤として用いたチロシン残基ラベル化反応を開発している [29]。本反応の機構を Scheme 1-1 に示した。本反応では $Ru(bpy)_3Cl_2$ 錯体存在下、光照射を行うことで Ru(II)が励起される。励起された Ru(II)*は溶液中の溶存酸素もしくは添加したペルオキソ過硫酸アンモニウム（APS）によって Ru(III)へと酸化される。この Ru(III)がチロシン残基のフェノールを一電子酸化することでチロシルラジカルが生じ、このラジカルが TRT と反応することでチロシン残基ラベル化反応が達成される。



Scheme 1-1. $Ru(bpy)_3$ 光触媒を用いたチロシン残基ラベル化機構

生理的条件下における Ru 光触媒とチロシンとの一電子移動反応は、半径約 1.5 nm の範囲内で起こることが報告されている [30]。すなわち、Ru 光触媒とリガンド結合タンパク質を 1.5 nm 以内まで接近させることができればリガンド結合タンパク質選択的なラベル化を達成することができることが想定された。実際に、リガンド連結型 Ru 光触媒を用いる事によって標的タンパク質選択的なラベル化を達成している（Figure 1-17）。

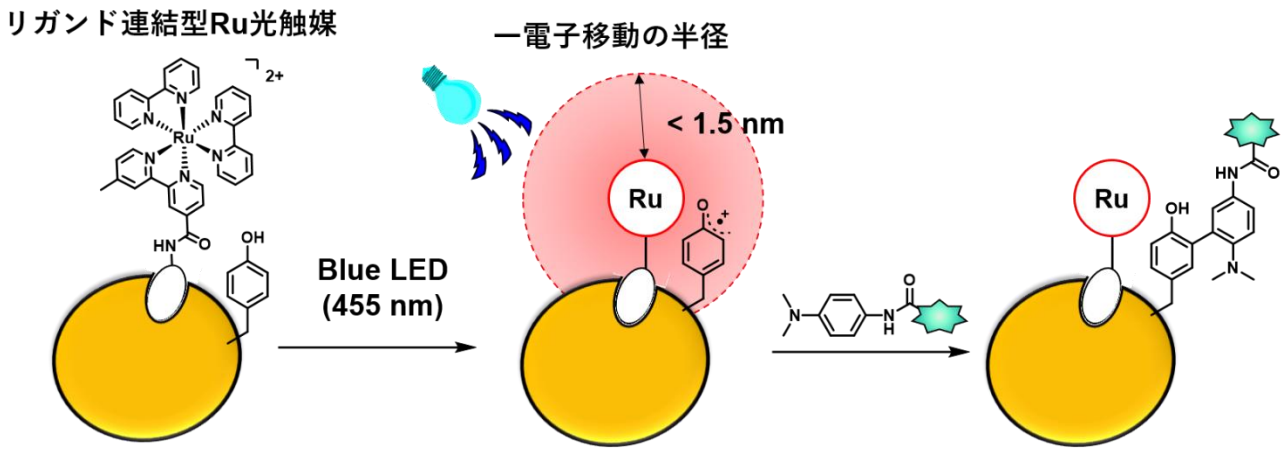


Figure 1-17. リガンド連結型 Ru 光触媒によるリガンド結合タンパク質のラベル化

リガンド連結型触媒を用いた手法ではないものの、ラジカル的なタンパク質ラベル化法として 2013 年に Rhee らが報告したアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APEX）と呼ばれる酵素を用いた手法がある [31]。過酸化水素存在下、APEX はラベル化剤であるチラミド構造中のフェノール性水酸基をラジカル化し、このラジカルが電子豊富なチロシン残基やヒスチジン残基、トリプトファン残基と反応するというものである（Figure 1-18）。このラジカルは短寿命（< 1 ms）かつ狭い範囲（< 20 nm）でアミノ酸残基と反応するという性質を持つため、APEX の近傍でのみラジカル種が生じる。詳細は後述するが、APEX を用いたラベル化反応は生細胞内でのタンパク質の局在解析やプロテオームマッピングに応用されており、ラジカル反応は細胞内でのタンパク質ラベル化に有用であることが示されている。

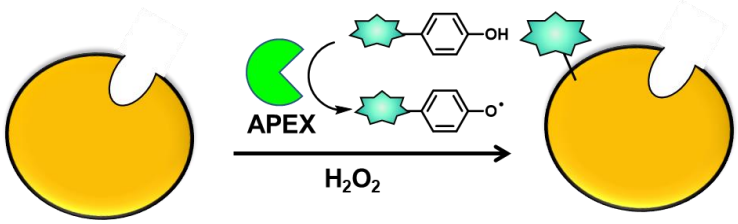


Figure 1-18. APEX を触媒としたラジカル的タンパク質ラベル化反応

求核性アミノ酸残基を狙う場合、標的タンパク質近傍で生じた活性種がアミノ酸残基と衝突しなければ反応は進行しない。そのため、リンカー長の厳密な制御が必要となる。一方で、これらのラジカル的なタンパク質ケミカルラベリングは一電子移動の起こる半径内にアミノ酸残基が存在すれば、触媒とアミノ酸残基が衝突しない距離にあってもラベル化が可能である。そのため求核性アミノ酸残基を標的とした場合よりも分子設計が容易である。また APEX 法のように標的とするタンパク質のみならず、その標的との相互作用の解析にも応用されていることから、標的の同定にとどまらず、そのタンパク質が生体内でどのようなタンパク質と近接しているのかを調べることが可能となる。

1-6. 固相上での共有結合形成反応を利用した標的タンパク質の精製

近年では、1-3 節で述べた光親和性標識法や 1-4 節で述べたタンパク質化学ケミカルラベリングを固相担体上で行う報告例、すなわち、アフィニティークロマトグラフィーとラベル化を組み合わせた例が報告されている。アフィニティービーズ上にタンパク質を共有結合形成によって不可逆な共有結合によって捕捉することでリガンド相互作用の弱いタンパク質を精製することに成功している。

1-6-1. 金ナノ粒子上での光親和性標識法による標的タンパク質精製

2016 年に櫻井らは金ナノ粒子上で光親和性標識を行うことで、リガンド（糖鎖）との相互作用が弱く、アフィニティークロマトグラフィーでは精製が困難なレクチンの精製を達成している（Figure 1-19）[32]。1-2-3 節（4）で述べたように、通常のアフィニティークロマトグラフィーでは洗浄操作によってリガンド相互作用の弱いタンパク質はリガンドから解離する。一方、この手法ではリガンドに結合したタンパク質を共有結合によって捕捉することで、洗浄によっても金ナノ粒子から解離することがない。この捕捉したタンパク質はチオール交換反応によってリンカーとともに金ナノ粒子から解離させることができる。

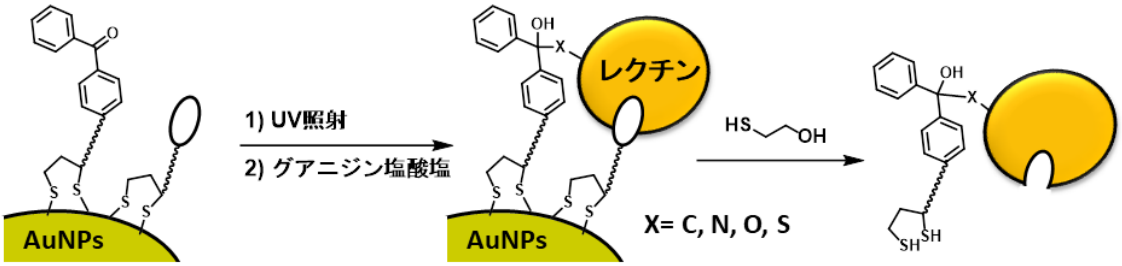


Figure 1-19. 金ナノ粒子上の光親和性標識によるレクチンの捕捉

1-6-2. 固相上でのアフィニティーラベリングによるタンパク質の精製・機能化

2014 年に戸嶋らは、固相上でアフィニティーラベリングを行い、標的タンパク質の精製および機能化を同時に行う手法論を報告している [33]。この手法ではα-ブロモケトンとリガンドをヒドラゾン含有リンカーで連結した分子を固相上に担持する。このビーズを用いてアフィニティー精製を行うと、標的タンパク質が求核性アミノ酸残基と反応し、共有結合を介してビーズ上に捕捉される。洗浄操作後、任意の機能性部位を有したオキシムを添加することでオキシム交換反応が起き、ビーズから標的タンパク質が解離するとともに、機能性分子を導入することができる。

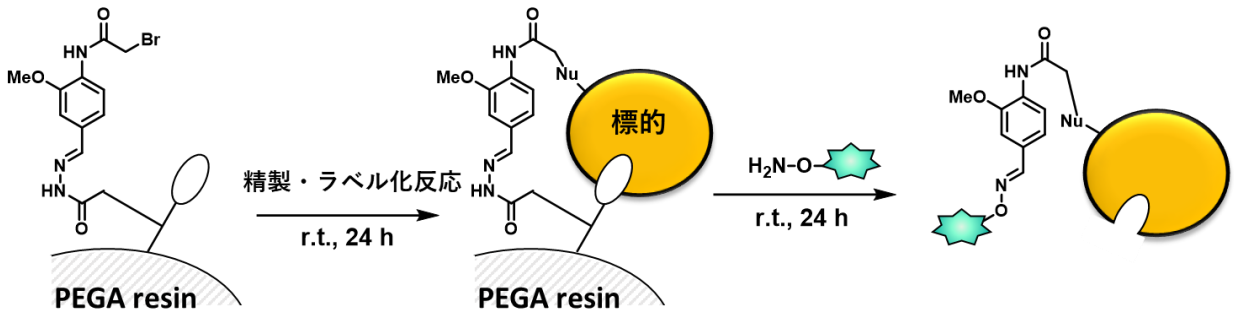


Figure 1-20. 固相上でのアフィニティーラベリングによる標的タンパク質の精製・機能化

1-7. タンパク質-タンパク質相互作用の解析手法

前節まででは低分子-タンパク質相互作用の解析方法の焦点をあて、種々のリガンド結合タンパク質ラベル化法について述べた。低分子-タンパク質相互作用の解析はリガンドの標的同定に重要な技術である。一方で、種々の生物学的プロセスや疾患のメカニズムの解明には低分子-タンパク質相互作用のみでなく、タンパク質-タンパク質相互作用の解析手法も重要である。タンパク質-タンパク質相互作用も低分子-タンパク質相互作用と同様に、アフィニティークロマトグラフィーやラベル化を用いることによって解析することが可能である。本節では一般的なタンパク質-タンパク質相互作用の解析方法から最新の研究について述べる。

1-7-1. AP-MS/IP-MS 法による相互作用タンパク質の解析法

1-2 節でアフィニティークロマトグラフィーの原理を述べた。1-2 節では低分子リガンドを担持した担体を用いたが、この担体上に解析対象タンパク質（protein of interest: POI）を担持することができれば、POI に相互作用するタンパク質を精製することが可能である。具体的には protein A や protein G などの抗体結合性のリガンドが担持されたアフィニティービーズを用いる。このビーズに抗 POI 抗体を結合させ、細胞破砕液中に添加することによって POI をビーズ上に担持することができる。抗 POI 抗体を用いた POI および POI 相互作用タンパク質を精製する手法を共免疫沈降法と呼ぶ。POI の相互作用タンパク質が既知の場合には、つづく western blot 法によって相互作用タンパク質の解析ができる。未知の相互作用タンパク質を同定する場合には精製した POI および相互作用タンパク質をトリプシン消化し、LC-MS/MS を用いた相互作用タンパク質の同定を行う。この共免疫沈降から LC-MS/MS による解析の一連の手法を AP-MS 法もしくは IP-MS 法と呼ぶ（Affinity purification with mass spectrometry: AP-MS, Immunoprecipitation with mass spectrometry: IP-MS）[34]。

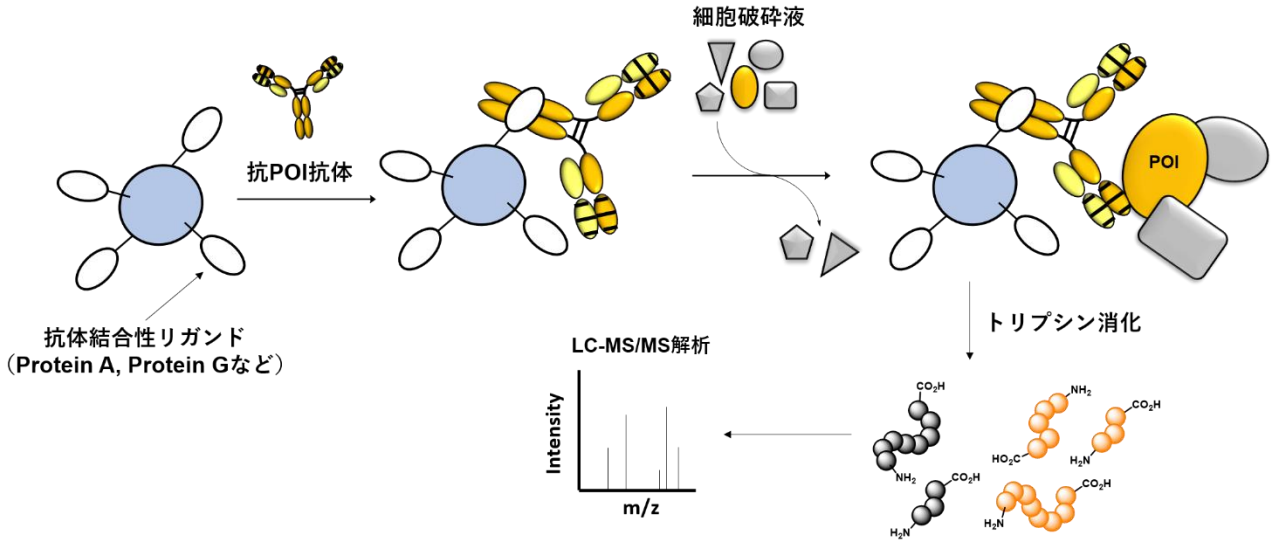


Figure 1-21. IP-MS, AP-MS の原理

1-2-4 節においてアフィニティークロマトグラフィーの問題点を述べたが、この問題点は同様の原理である AP-MS 法、IP-MS 法にも共通である。特に PPI は $K_d > 10^{-6}$ M の弱い親和性を持つものが多いが、AP-MS 法および IP-MS 法では解析対象は相互作用の強いものに限定されてしまう [35]。

また、細胞破砕液を用いることから、タンパク質の局在や生細胞内環境における動態は解析結果に反映されない。このような背景から、生細胞内で、弱い PPI を解析できるような手法が注目され、近年開発されている。

1-7-2. HRP 連結抗体を用いた細胞膜上 PPI ラベリング

前述の AP-MS/IP-MS 法では抗 POI 抗体を用いることによってビーズ上に POI および相互作用タンパク質を捕捉している。一般的に Western blot 法を用いる場合には、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を連結した抗 POI 抗体もしくは抗 POI 抗体に次いで二次抗体に HRP 連結抗体を用いる。この HRP を触媒として POI や相互作用タンパク質をラベル化するというアプローチが EMARS 法（enzyme-mediated activation of the radical source）[36] や SPPLAT 法（selective proteomic proximity labeling assay using tyramide）[37] として知られる。EMARS 法ではアリールアジドをラベル化剤として用い、HRP 触媒下生じるナイトレンによって、SPPLAT 法では、1-5 節で述べた APEX 触媒によるラベル化でも用いられるチラミドをラベル化剤として用い、HRP 触媒下生じるフェノキシラジカルによって、POI や相互作用タンパク質をラベル化する（Figure 1-22）。HRP はヒト細胞内の還元条件下で失活してしまうことから、本手法の適用範囲は細胞膜上のタンパク質に限定される。詳細は後述するが、このような背景のもと、細胞内でもラベル化が可能な APEX 触媒が開発されている [38]。

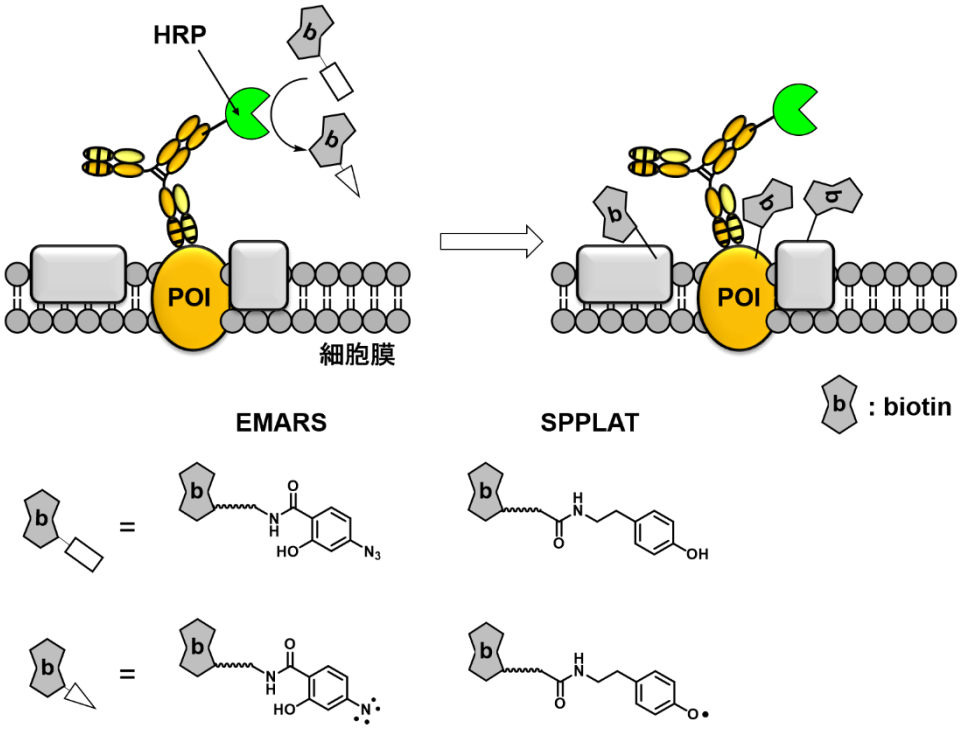


Figure 1-22. HRP 触媒による膜タンパク質上でのラベル化（EMARS 法、SPPLAT 法）

1-7-3. 酵素タグ融合 POI を用いた細胞内環境下における相互作用タンパク質ラベル化

前節の EMARS 法、SPPLAT 法は膜タンパク質に解析対象が制限される。細胞内で相互作用タンパク質を解析する方法として、ビオチンリガーゼを酵素とした BioID 法（biotin identification）が広く知られている [39]。ビオチンリガーゼには大腸菌内で発現するアセチル-CoA カルボキシラーゼをビオチン化する *BirA* が用いられる。*BirA*-POI 融合タンパク質を遺伝子工学的に発現させ、ビオチンと ATP を添加することによって、biotin-5'-AMP が活性種として形成され、およそ半径 10 nm 以内に存在するタンパク質のリジン残基と反応する。*BirA* は 15 残基からなる biotin acceptor peptide (BAP) が基質であるため、この酵素を用いる場合には BAP をあらかじめ解析対象に導入する必要がある [39a]。そこで、解析対象に BAP を導入することなく、あらゆるタンパク質をラベル化し相互作用を解析できる方法として、*BirA* に変異を導入した *BirA**が開発された [39b]。この *BirA**を用いる近接ラベル化を BioID と呼ぶ。しかしながら BioID 法は 24 時間の長時間のラベル化反応であるため、時間依存的なタンパク質の動態解析には不適である。この長時間の反応を改善するために、*BirA* の 14 アミノ酸残基に対して変異を加えたビオチンリガーゼを用いる TurboID 法という改変法が開発されている [40]。反応時間が 24 時間から 10 分程度へと劇的に改善されている。しかしながら、通常の BioID を用いる方法よりも非特異的なラベル化反応が起きやすい点や細胞に対する毒性が問題視されており、この非特異的なラベル化や毒性を改善した方法として AirID が開発されている [41]。AirID は毒性や非特異反応は改善するものの、TurboID の 10 分という反応時間に対して 3 時間の反応を必要としている。

また BioID 法以外の細胞内 PPI ラベル化法として、1-5 節でも述べた APEX 法（engineered ascorbate peroxidase）がある [42]。APEX 触媒下、ラベル化剤チラミドから生じるラジカルが短寿命（< 1 ms）かつ狭い範囲（< 20 nm）で芳香族アミノ酸残基と反応する。迅速なラジカル反応によってわずか 1 分という短時間でのラベル化が実現している。しかし、APEX の活性化のために高濃度の過酸化水素を添加しなければいけないため、細胞内に存在する redox sensitive なタンパク質は失活することが懸念される [43]。

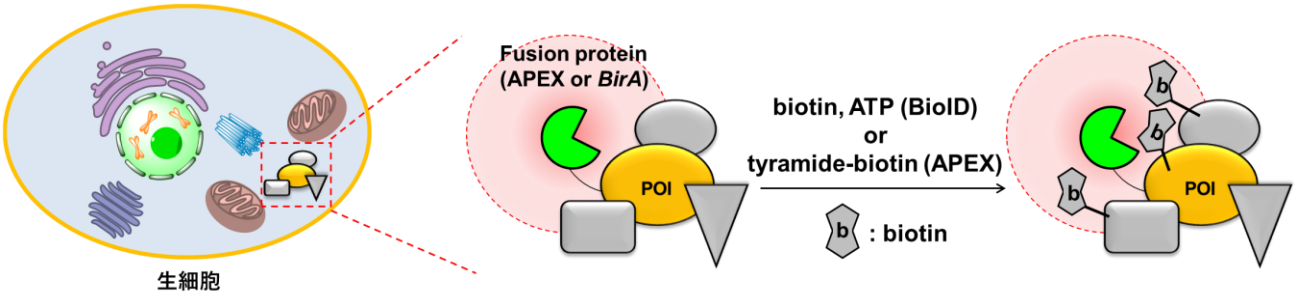


Figure 1-23. BioID 法、APEX 法による細胞内での相互作用タンパク質ラベル化

1-7-4. 可視光照射による POI 相互作用タンパク質ラベル化法

前述した融合酵素を使うラベル化方法は長時間の反応時間を必要とすること（BioID）、短時間でできる方法は非特異的なラベル化反応や細胞毒性（TurboID）、高濃度の過酸化水素の使用（APEX）などそれぞれの方法に課題がある。近年、より短時間かつ細胞に対する毒性が低い方法として可視光で進行するラベル化反応が種々開発されてきている。

MacMillan らはイリジウム光触媒を用いてジアジリンからカルベンを形成する反応を開発し、本反応を活用し細胞膜上で POI や相互作用タンパク質をラベル化することに成功している（MicroMap 法）[44]。本反応は短寿命（2 ns）かつ小さなラベル化半径（< 4 nm）を持つカルベン種によって微小環境でのラベル化が可能となっている（Figure 1-24）。HRP を用いる SPPLAT 法と比較して POI 関連タンパク質を高効率・選択的に解析できる手法となっている。

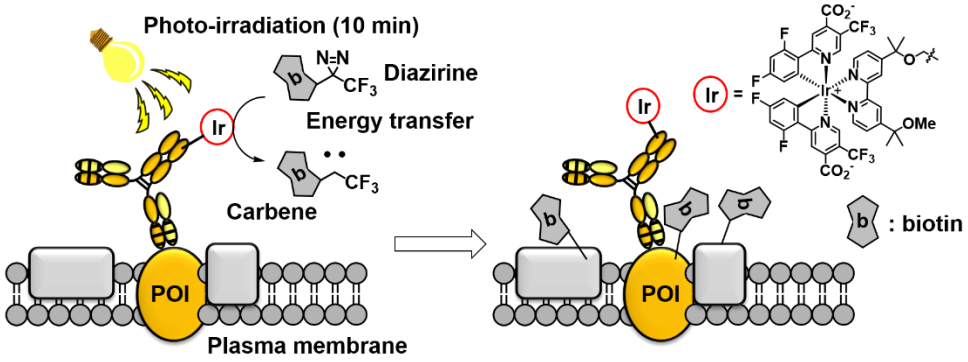


Figure 1-24. イリジウム光触媒下、ジアジリンから生じるカルベン種による相互作用タンパク質のラベル化（MicroMap 法）

MicroMap 法は細胞膜上での相互作用の解析にとどまっているが、同じく 2020 年に Moellering らによって細胞内で redox sensitive なタンパク質相互作用をラベル化できる、PhotoPPI 法（photoproximity protein interaction）が開発されている[45]。PhotoPPI 法では SNAP タグ融合 POI を細胞内に発現させ、光親和性標識基（ジアジリン）、検出基、SNAP タグのリガンドを光で切断可能なリンカーで連結する。UV 照射によってジアジリンからのカルベン形成とリンカーの切断が起こる。これにより POI や近傍に存在する相互作用タンパク質がラベル化される。PhotoPPI 法では解析対象にとして Keap 1 を選定しており、本タンパク質は生体内の活性酸素種のセンサーである。Keap 1 のタンパク質表面にはシステイン残基のチオール基が多数存在し、このチオールが酸化環境を感知し抗酸化に関わる遺伝子の発現を行う。すなわち、前述した APEX 法では高濃度の過酸化水素を添加するため、酸化による影響を受け、解析が困難であった。しかし、PhotoPPI 法では光照射によるラベル化であるため、APEX 法ではラベル化できないタンパク質を解析対象とできることが示されている。

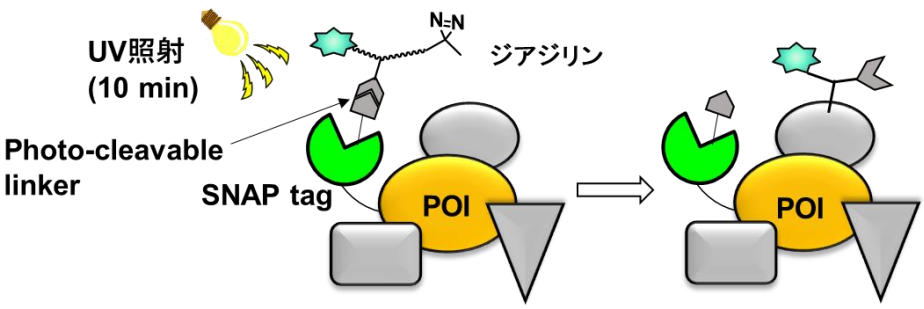


Figure 1-25. 光親和性標識法と photo-cleavable リンカーを活用した細胞内での相互作用タンパク質ラベル化（PhotoPPI 法）

また、イリジウム光触媒を用いた細胞膜タンパク質のラベル化方法として MicroMap について述べたが、有機光触媒を用いれば細胞内でのタンパク質ラベル化が可能となる。タンパク質-タンパク質相互作用をラベル化するという目的とは異なるが、2020 年に浜地らはジブロモフルオレセインを光触媒とし、核の染色試薬 Hoechst と連結している。本触媒分子と *o*-フェニレンジアミンをラベル化剤として用いることで可視光照射条件下、核内のタンパク質をラベル化することに成功している。

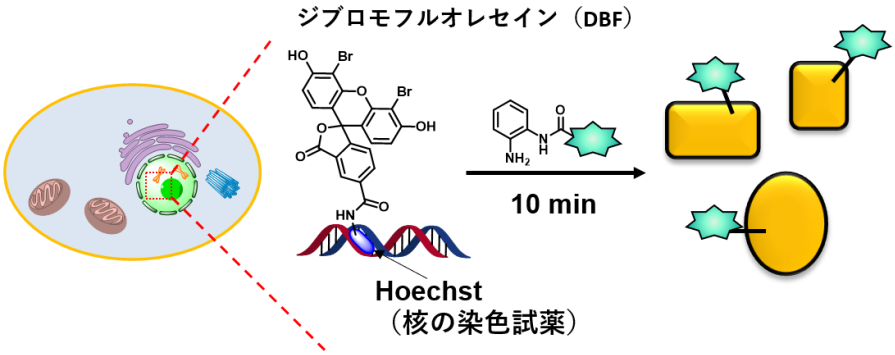


Figure 1-26. 有機光触媒を用いた細胞内タンパク質のラベル化

1-8. 本論文の概要

本論文は「光触媒近傍で起こるラジカル的タンパク質ラベル化法を活用した生体分子間相互作用解析法の開発」という題目で以下の六章から構成される。

第一章「序論」では低分子-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用の解析手法ついて述べた。低分子-タンパク質相互作用は相互作用の弱いものを高感度に検出できる手法は少ないこと、タンパク質-タンパク質相互作用は細胞内の解析対象に対して、迅速にかつ細胞への損傷なく、弱い一過性の相互作用を検出する方法がないことを述べ、本研究の意義を明らかとした。

また、1-2 節、1-3 節で述べたアフィニティークロマトグラフィーやアフィニティーラベリングについて、特徴をまとめると以下の表のようになる。

Table 1-2. 従来の低分子-タンパク質相互作用解析法の概要

	アフィニティーラベリング 光親和性標識法	アフィニティー クロマトグラフィー
分子設計の容易さ	×	○
精製の容易さ	△	◎
検出感度	△	×
リガンド結合力の弱い タンパク質への適用	○	×

アフィニティーラベリングでは、反応基をタンパク質のアミノ酸残基と結合できる位置に配置する必要があり、リンカー長の厳密な制御を必要とする。さらに、タンパク質との共有結合形成の効率も高くないため、検出感度にも課題が残っている。アフィニティークロマトグラフィーは最小限のリガンドの構造変換によって標的タンパク質を精製できる。しかし、銀染色法の検出限界（数 ng 程度）やタンパク質の適用範囲（K_d ＜1 μM の結合力が必要）に制限があり、微量のタンパク質や、リガンドとの結合力が弱いタンパク質の解析が困難である。

そこで本論文の第二章から第四章では、上記の課題を解決するためにアフィニティークロマトグラフィーとタンパク質ラベル化技術を組み合わせることで上記課題の解決を行うこととした。具体的には、アフィニティービーズ上にタンパク質ラベル化の触媒を担持し、アフィニティービーズ上での触媒的タンパク質ラベル化による高効率なリガンド相互作用のラベル化法に着手することとした。この触媒担持アフィニティービーズを用いてタンパク質を精製後、ラベル化を行えば精製したタンパク質を高感度に検出することが可能となる。また、リガンドとの相互作用が弱い場合には、精製操作を行わずタンパク質混在系でラベル化反応を行うことで、リガンド結合タンパク質の網羅的な解析が可能となる（Figure 1-26）。

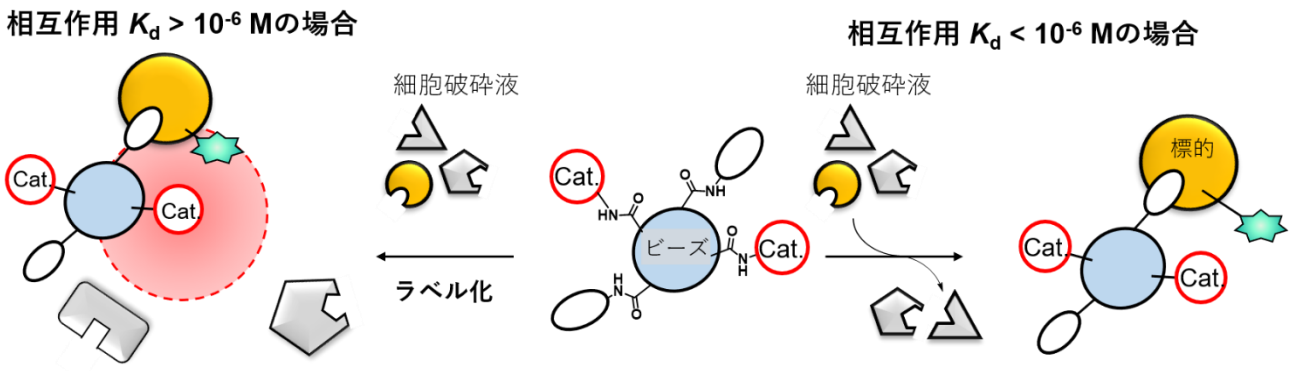


Figure 1-27. アフィニティービーズ上での触媒的タンパク質ラベル化法の活用

数あるタンパク質ラベル化法の中でも、ラジカル的タンパク質ラベル化法は特に威力を発揮すると期待した。前述したとおり、求核性アミノ酸残基との求電子的なタンパク質ラベル化は、アミノ酸残基とリガンドが連結したラベル化剤が衝突する必要がある。触媒を用いたラジカル的なタンパク質ラベル化は、触媒とアミノ酸残基が衝突しなくても触媒分子の半径数 nm 以内にアミノ酸残基が存在すればラベル化を行うことができる。すなわち厳密なリンカー長の制御を必要とせずにリガンド結合タンパク質をラベル化できると考えた。具体的には、可視光照射条件でラジカル的にタンパク質チロシン残基をラベル化可能な Ru 光触媒をアフィニティービーズ上に担持することとした。本光触媒担持アフィニティービーズによって、シンプルな分子設計のもと、高感度にリガンド相互作用が弱いタンパク質であっても検出できる手法の確立を目的とした（Figure 1-28）。

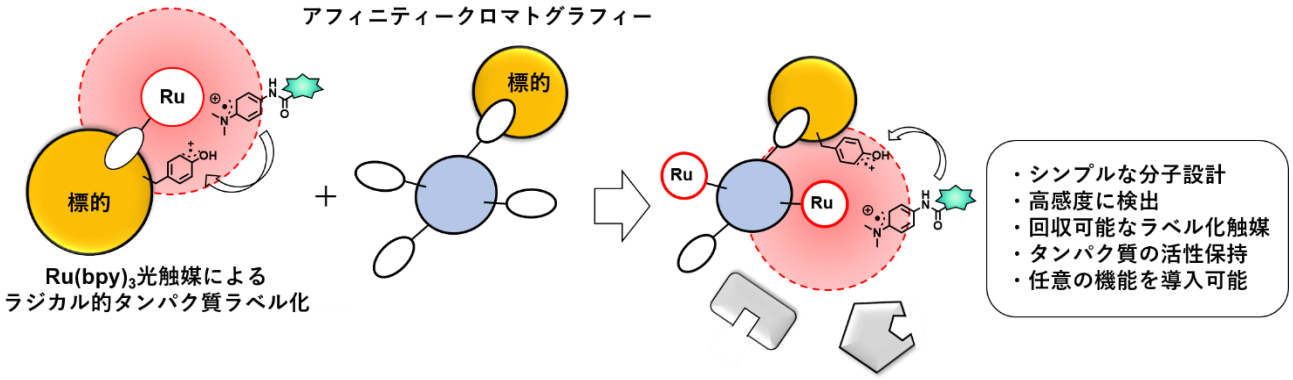


Figure 1-28. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド-タンパク質相互作用検出法の開発

そこで、第二章「リガンド結合タンパク質の精製とラベル化を同時に可能とする光触媒担持アフィニティービーズの開発」では Ru 光触媒担持アフィニティービーズを作製し、リガンド結合タンパク質を精製しつつ、高感度に検出することが可能となる手法の開発に取り組み、従来法の検出感度の課題解決に取り組んだ。この検討の中で、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でリガンド結合タンパク質を選択的な精製を可能とするタンパク質吸着性の低い Ru 光触媒（Ru/dcbpy 錯体）を開発したので詳細を述べる。

第三章「ラジカル近接ラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) の開発」では Ru 光触媒担持ビーズを用いて、細胞破砕液中のリガンド結合タンパク質のラベル化を検討しようとしたところ、本ラベル化方法ではリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化できないことが明らかとなった。この原因を精査したところ、チロシン残基のみならずラベル化剤 TRT も Ru 光触媒によってラジカル化されることが示唆された。TRT のラジカルは広いラベル化半径を有するために、リガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することが困難であることがわかった。この結果を受け、タンパク質混在系でのリガンド結合タンパク質のラベル化を達成するために、触媒のごく近傍のみでラベル化が可能なラベル化剤（近接ラベル化剤）の探索を行った。見出した近接ラベル化剤（MAUra）を Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのラベル化に応用し、リガンド結合タンパク質選択的かつ高効率ラベル化を確立したので詳細を述べる。

第四章「弱いリガンド-タンパク質相互作用を解析可能にする光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化法の開発」では、第二章で開発した Ru 光触媒担持アフィニティービーズと第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を用い、アフィニティークロマトグラフィーやアフィニティーラベリングでは検出が困難であるリガンド結合タンパク質のラベル化・同定を行った。リガンドとの相互作用が弱く従来法での検出が難しい糖結合タンパク質（レクチン）を Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化によってラベル化し同定するのみでなく、標的レクチンに対する相互作用タンパク質もラベル化・同定することに成功したため詳細を述べる。

第五章「生細胞内での光触媒近接ラベル化を活用したタンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発」では、第三章で見出した近接ラベル化剤 MAUra を用いたラベル化を生細胞内でのタンパク質相互作用の解析手法へと応用した。1-7 節で近年まで開発されてきたタンパク質-タンパク質相互作用の解析法を述べてきたが、細胞内の相互作用タンパク質を迅速かつ温和な条件でラベル化する手法は少ない。一方、上記の Ru 光触媒によるラジカル的ラベル化反応では、酸化剤の添加を必要とせず、APEX 法と同様にミリ秒オーダーで進行するラジカル反応によるラベル化を光刺激のみで進行させることが可能である。もし、このラベル化を細胞内で行うことができれば短時間かつ温和な条件で PPI を検出可能な手法となりうる。しかしながら細胞内でのラベル化には膜透過性に優れる光触媒を探索する必要がある。そこで、細胞膜透過性に優れる有機光触媒を探索し、選定した有機光触媒による解析対象タンパク質近傍の相互作用タンパク質ラベル化を実施した。細胞内環境で迅速かつ温和なラベル化反応を達成しただけでなく、従来の APEX 法や BioID 法よりも局所的な環境でラベル化が可能であることを見出したので詳細を述べる。

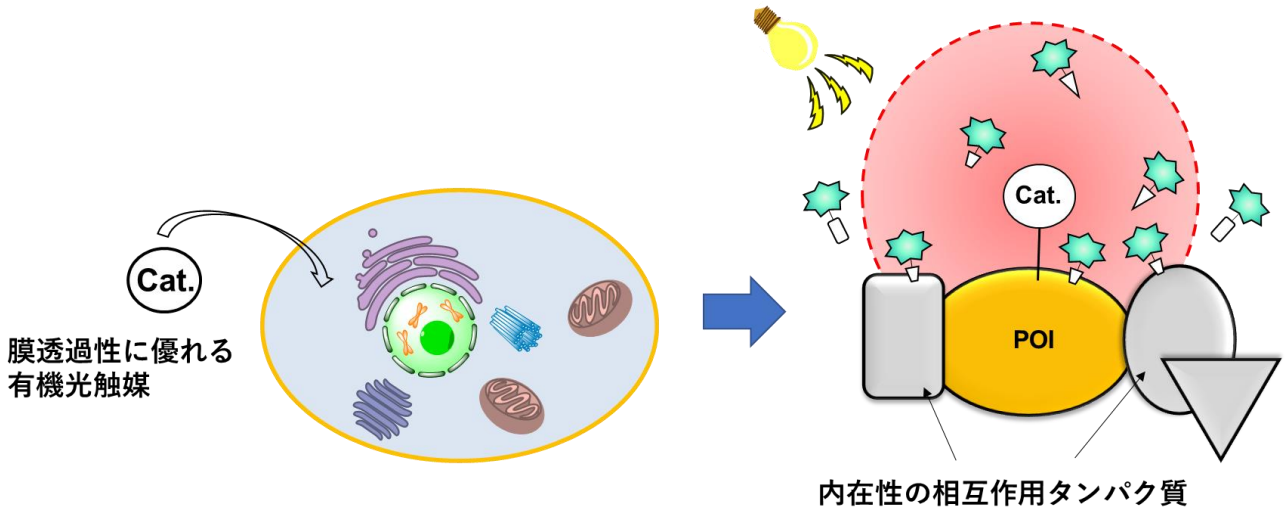


Figure 1-29. 有機光触媒を用いた細胞内タンパク質相互作用のラベル化

第六章「結論」では本論文を総括した。

1-9. Reference

1. Shimomura, O., Jhonson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239.
2. Willmann, J. K.; Bruggen, N. V.; Dinkelborg, L. M.; Gambhir, S. S., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008,** *7,* 591-607.
3. Ziegler, S.; Pries, V.; Hedberg, C.; Waldmann, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013,** *52,* 2744-2792.
4. (a) Schreiber, S. L. *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 51-61. (b) Harding, M., Galat, A., Uehling, E. D., Schreiber, S. L. *Nature* **1989**, *341*, 758-760. (c) Liu, J.; Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807-815. (d) Schreiber, S. L. *Science* **1991**, *251*, 283-287.
5. Nakatsuka, M., Ragan, J. A., Sammakia, T., Smith, D. B., Uehling, D. E., Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5583-5601.
6. (a) 「アフィニティークロマトグラフィー」笠井献一、松本勲武、別府正敏 著、東京化学同人（1991） (b) 「ナノアフィニティービーズのすべて」半田宏、川口春馬 著、中山書店（2003）.
7. Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H., *Science,* **2010**, *327*, 1345-1350.
8. Shimizu, N.; Sugimoto, K.; Tang, J.; Nishi, T.; Sato, I.; Hiramoto, M.; Aizawa, S.; Hatakeyama, M.; Ohba, R.; Hatori, H.; Yoshikawa, T.; Suzuki, F.; Oomori, A.; Tanaka, H.; Kawaguchi, H.; Watanabe, H.; Handa, H., *Nat. Biotechnol.* **2000,** *18,* 877–881.
9. Nishio, K.; Masaike, Y.; Ikeda, M.; Narimatsu, H.; Gokon, N.; Tsubouchi, S.; Hatakeyama, M.; Sakamoto, S.; Hanyu, N.; Adarsh, S.; Kawaguchi, H.; Abe, M.; Handa, H., *Colloids Surf., B* **2008**, *64*, 162-169.
10. Omar, B.; Gonçalo, J. L. B., *Chem. Rev.* **2015,** *115,* 2174−2221.
11. (a) N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15942. (b) S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 1080. (c) Ban, H.; Gavrilyuk, J.; Barbas, C. F., *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, *132*, 1523. (d) Seim, K.; Obermeyer, A.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16970. (e) Gavrilyuk, J.; Ban, H.; Nagano, M.; Hakamata, W.; Barbas, C. F., *Bioconjugate Chem*. **2012**, *23*, 2321. (f) Sato, S.; Nakamura, K.; Nakamura, H., *ACS Chem. Biol*. **2015**, *10*, 2633.
12. (a) J. M. Antos, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256. (b) J. M. Antos, J. M. McFarland, A. T. Lavarone, M.B. Francis, *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 6301. (c) Seki, Y., Ishiyama, T., Sasaki, D., Abe, J., Sohma, T., Oisaki, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 10798. (d) S. J. Tower, S. J. Tower, W. J. Hetcher, T. E. Myers, N. J. Kuehl, and M. T. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 9112–9118.
13. S. Jia, D. He, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2019,** *141,* 7294−7301.
14. (a) Lin, S.; Yang, X.; Jia, S.; Weeks, A. M.; Hornsby, M.; Lee, P. S.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A.T.; Wells, J. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J., *Science* **2017,** *355,* 597-602. (b) M. T. Taylor, J. E. Nelson, M. G. Suero, M. J. Gaunt, *Nature* **2018**, *562*, 563–568.
15. S. Bloom, C. Liu, D. K. Kölmel, J. X. Qiao, Y. Zhang, M. A. Poss, W. R. Ewing, D. W. C. MacMillan, *Nat. Chem.* **2017,** *10,* 205-211.
16. C. B Rosen, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2017,** *13,* 697–705.
17. (a) Cheng, X.; Li, L.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q., *Chem. Comm.* **2014,** *50,* 2851. (b) Zhao, Q.; Ouyang, X., *J. Am. Chem. Soc.* **2017,** *139,* 680.

18. (a) Florence, K.-H.; Isabelle, K.; Maurice G., *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1995,** *34,* 1296-1312. (b) Dormán, G.; Nakamura, H.; Pulsipher, A.; Prestwich, G. D., *Chem. Rev.* **2016,** *116,* 15284–15398.
19. (a) Ballell, L.; Scherpenzeel, M.; Buchalova, K.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J.; *Org. Biomol. Chem.* **2006,** *4,* 4387-4394. (b) Sakurai, K.; Ozawa, S.; Yamada, R.; Yasui, T.; Mizuno, S., *ChemBioChem* **2014,** *15,* 1399-1403.
20. Shi, H.; Zhang, C-J.; Chen, G. Y. J.; Yao, S. Q., *J. Am. Chem. Soc.* **2012,** *134*, 3001.
21. J. J. Fischer, C. Dalhoff, A. K. Schrey, O. Y. Graebner neé Baessler, S. Michaelis, K. Andrich, M. Glinski, F. Kroll, M. Sefkow, M. Dreger, H. Koester, *J. Proteomics.* **2011,** *75,* 160-168.
22. (a) Sakurai, K., *Asian J. Org. Chem.* **2015,** *4,* 116 – 126. (b) M. Hashimoto and Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.,* **2008,** 2513–2523.
23. S. Tsukiji, M . Miyagawa, Y . Takaoka, T . Tamura, I .Hamachi, *Nat. Chem. Biol*. **2009**, *5*, 341.
24. S. Fujishima, R . Yasui, T . Miki, A . Ojida, I . Hamachi, *J . Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3961.
25. Y. Takaoka, Y . Nishikawa, Y . Hashimoto, K . Sasaki, I . Hamachi, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3217.
26. (a) Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 245. (b) T. Hayashi, Y. Yasueda, T. Tamura, Y. Takaoka, and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5372−5380.
27. Tamura, T.; Song, Z.; Amaike, K.; Lee, S.; Yin, S.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2017,** *139*, 14181−14191.
28. (a) Brian V. Popp and Zachary T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2010,** *132*, 6660. (b) Z. Chen, B . V . Popp, C . L . Bovet, Z . T . Ball, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 920.
29. (a) Sato, S.; Nakamura, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8681. (b) Sato, S.; Morita, K.; Nakamura, H., *Bioconjugate Chem.* **2015,** *26*, 250−256.
30. C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47−52.
31. H. W. Rhee, P. Zou, N. D. Udeshi, J. D. Martell, V. K. Mootha, S. A. Carr and A. Y. Ting, *Science* **2013,** *339*, 1328–1331.
32. Sakurai, K.; Hatai, Y.; Okada, A., *Chem. Sci.* **2016,** *7*, 702.
33. Kuwahara, D.; Hasumi, T.; Kaneko, H.; Unno, M.; Takahashi, D.; Toshima, K., *Chem Commun.* **2014,** *50*, 15601.
34. F. E. Paul, F. Hosp, M. Selbach, *Methods* **2011**, *54*, 387-395.
35. (a) J. R. Perkins, I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees and C. Orengo, *Structure,* **2010**, *18,* 1233–1243. (b) J. Yoo, T. S. Lee, B. Choi, M. J. Shon and T. Y. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.,* **2016**, *138,* 14238–14241.
36. N. Kotani, J. Gu, T. Isaji, K. Udaka, N. Taniguchi, K. Honke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2008,** *105,* 7405-7409.
37. X. W. Li, J. S. Rees, P. Xue, H. Zhang, S. W. Hamaia, B. Sanderson, P. E. Funk, R. W. Farndale, K. S. Lilley, S. Perrett, and A. P. Jackson, *J. Biol. Chem.,* **2014,** *289*, 14434–14447.
38. Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., *et al. Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 1143‑1148.

39. (a) E. de Boer, P. Rodriguez, E. Bonte, J. Krijgsveld et al., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **2003,** *100*, 7480. (b) K. J. Roux, D. I. Kim, M. Raida, B. Burke, *J. Cell Biol.* **2012,** *196,* 801−810.
40. T. C. Branon, J. A. Bosch, A. D. Sanchez, N. D Udeshi, T. Svinkina, S. A. Carr, J. L. Feldman, N. Perrimon, & A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.,* **2018**, *36*, 880–887.
41. K. Kido, S. Yamanaka, S. Nakano, K. Motani, S. Shinohara, A. Nozawa, H. Kosako, S. Ito and T. Sawasaki, *Elife,* **2020,** *9,* e54983, doi: 10.7554/eLife.54983.
42. (a) H-W. Rhee, P. Zou, N. D. Udeshi, J. D. Martell, V. K. Mootha, S. A. Carr, A. Y. Ting, *Science,* **2013**, *339*, 1328-1331. (b) S. S. Lam, J. D. Martell, K. J. Kamer, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, V. K. Mootha, A. Y. Ting, *Nature Methods,* **2015**, *12,* 51-54.
43. (a) Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G. M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M. B.; Bachovchin, D. A.; Mowen, K.; Baker, D.; Cravatt, B. F. *Nature* **2010**, *468*, 790−795. (b) van der Reest, J.; Lilla, S.; Zheng, L.; Zanivan, S.; Gottlieb, E. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1581.
44. J. B. Geri, J. V. Oakley, T. Reyes-Robles, T. Wang, S. J. McCarver, C. H. White, F. P. Rodriguez-Rivera, D. L. Parker Jr., E. C. Hett, O. O. Fadeyi, R. C. Oslund, D. W. C. MacMillan, *Science* **2020**, *367*, 1091–1097.
45. D. C. McCutcheon, G. Lee, A. Carlos, J. E. Montgomery, and R. E. Moellering, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 146−153.
46. T. Tamura, M. Takato, K. Shiono, and I. Hamachi, *Chem. Lett*., **2020**, *49*, 145-148.

第二章

リガンド結合タンパク質の精製とラベル化を同時に可能とする光触媒担持アフィニティービーズの開発

2-1. はじめに

本研究の目的は生体分子間相互作用の解析を可能とする光触媒近接ラベル化法を開発することである。本章では、生体分子間相互作用の中でも、低分子リガンド-タンパク質相互作用の検出を志向し、アフィニティークロマトグラフィーと Ru 光触媒によるタンパク質ラベル化法を組み合わせることを着想した。具体的には、アフィニティークロマトグラフィーのビーズ上に特定のタンパク質に対する親和性リガンドとラベル化のための Ru 光触媒を同時に担持する。これにより、精製したリガンド結合タンパク質を蛍光や化学発光で高感度に検出することが可能となる。そこで、精製・ラベル化に最適な Ru 光触媒の開発を行い、選定された Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いた細胞内在性微量タンパク質の精製・ラベル化を検討した。

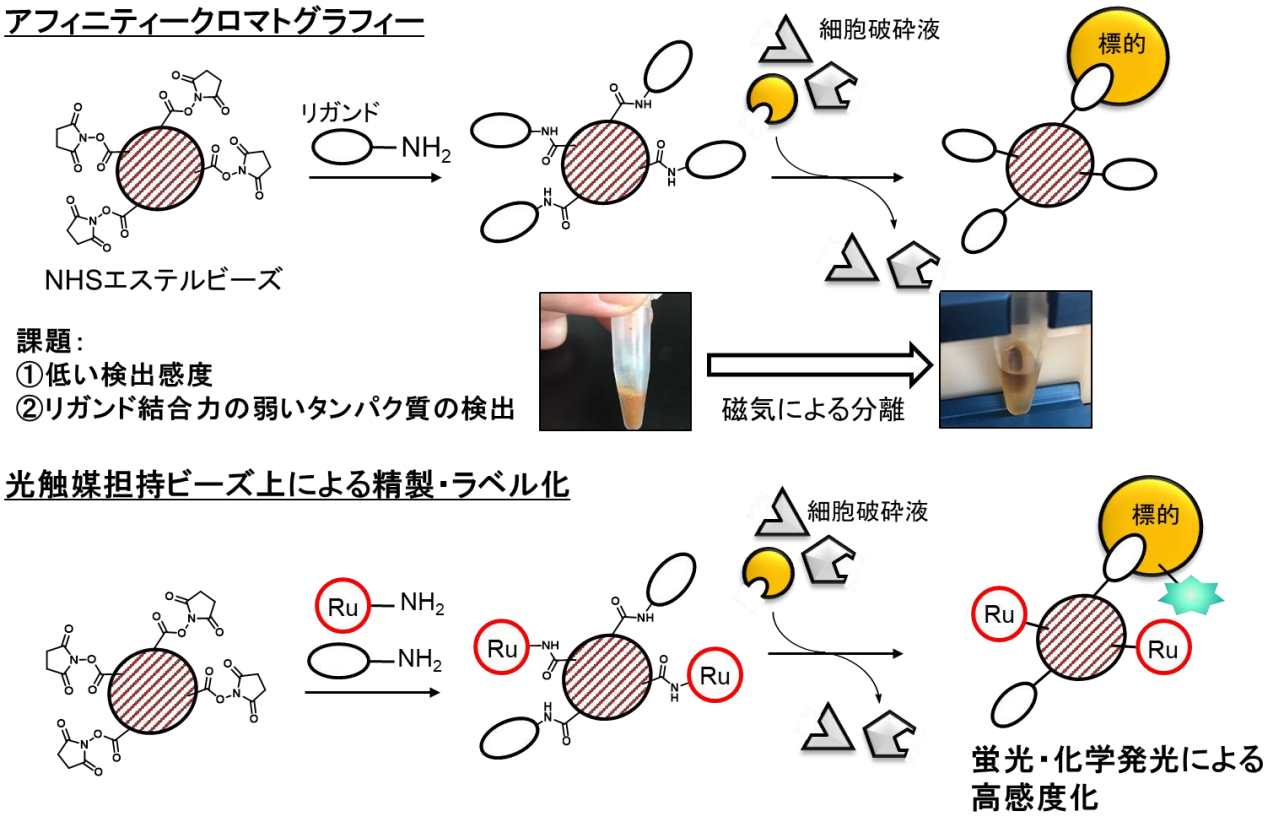


Figure 2-1. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での精製・ラベル化

2-2. Ru 光触媒の分子設計

序論でも述べたとおり、小分子リガンドをビーズ上に担持する手法は様々である。その中でも室温という温和な条件で、剛直なアミド結合を介して分子を迅速に担持できるという点から、NHS エステル法を用いた方法でリガンドや Ru 光触媒を担持することとした。Ru 光触媒を担持するにあたり、リンカー末端にアミノ基を有した Ru 光触媒の合成を計画した。また、分子の疎水性はタンパク質の非特異的な吸着を引き起こす場合があるため、リンカーは疎水性の高いヘキシルアミンリンカーと親水性の高いポリエチレングリコール（PEG）リンカーの二種類について評価することとした（Figure 2-2）。PEG リンカーについては PEG の中でも短い分子量 300 程度 (n = 6) のものを用いた。

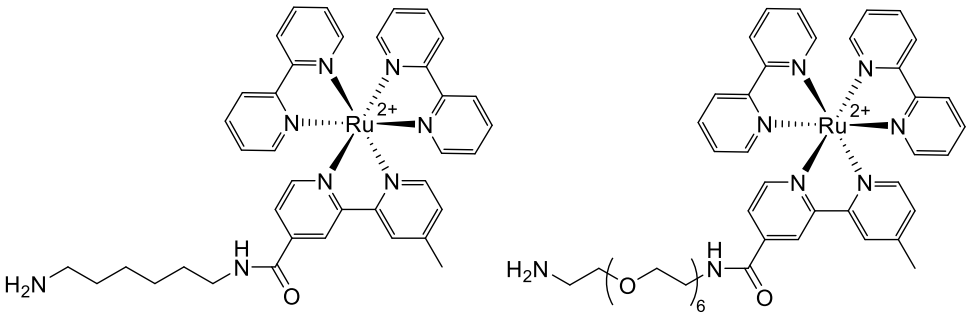
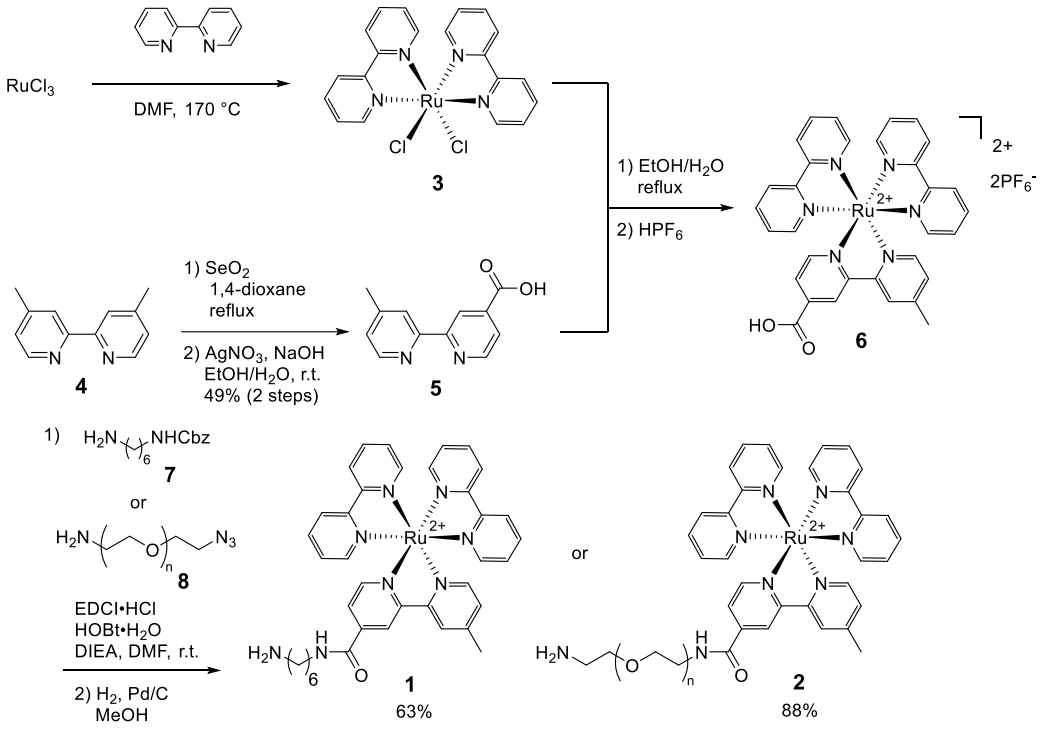


Figure 2-2. アフィニティービーズに担持する Ru 光触媒の分子設計

2-3. 光触媒担持アフィニティービーズに最適な Ru 光触媒の開発

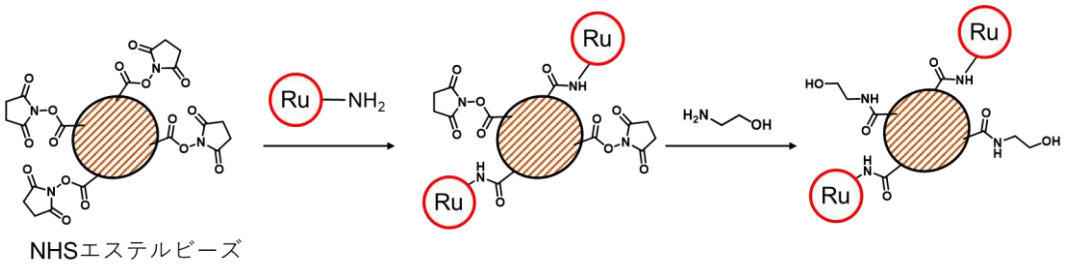
2-3-1. リンカーの異なる Ru 光触媒誘導体の合成

リンカーの異なる $Ru(bpy)_3$ 錯体誘導体 **1** および **2** の合成法を Scheme 2-1 に示した。配位子構造に 1 つカルボキシル基を有した $Ru(bpy)_3$ 錯体誘導体 **6** は、既報の文献[1]に従い $RuCl_3$ に 2 当量のビピリジンを配位させた Ru 錯体 **3** と、ビピリジン誘導体 **4** の片方のメチル基を酸化しカルボン酸へと誘導した配位子 **5** を反応させることで得た。この Ru 錯体 **6** のカルボン酸と片方のアミンが保護されたジアミンリンカー**7** および **8** との縮合反応を行い、水素添加反応による Cbz 基やアジド基の脱保護によって種々のリンカーを導入した $Ru(bpy)_3$ 錯体誘導体（**1**, **2**）を合成した。



Scheme 2-1. アミンリンカー含有 Ru 光触媒の合成

2-3-2. Ru 光触媒 1, 2 担持ビーズのタンパク質吸着性の評価



Scheme 2-2. Ru 光触媒担持ビーズの調製法

Ru 光触媒担持ビーズの作製法を Scheme 2-2 に示した。NHS エステルで表面修飾された FG ビーズ[2]に対して、合成した Ru 光触媒 **1**, **2** を担持した後、未反応の NHS エステルを 2-アミノエタノールでキャッピングすることによって Ru 光触媒担持ビーズを作製した。

Ru 光触媒のビーズへの担持による非特異的なタンパク質の吸着の有無を確認する目的で、これらの Ru 光触媒担持ビーズを HeLa 細胞破砕液中に懸濁させ、吸着したタンパク質を熱変性により溶出、SDS-PAGE によってタンパク質量を評価した（Figure 2-3）。Ru 光触媒 **1**, **2** を担持していない場合はタンパク質の吸着がほとんど見られなかったことから、ビーズに対するタンパク質の吸着はほとんどないことがわかった。しかし、Ru 光触媒 **1**, **2** を担持した場合には、リンカーの疎水性・親水性に関わらず、タンパク質の非特異的な吸着が生じることがわかった。以上のことから、タンパク質の非特異的な吸着の原因を Ru 光触媒の構造そのもの、具体的には Ru の持つ 2+の電荷にあるのではないかと考えた。そこで、Ru の 2+の電荷を中和できるアニオンを有する Ru 光触媒の合成を検討することとした。

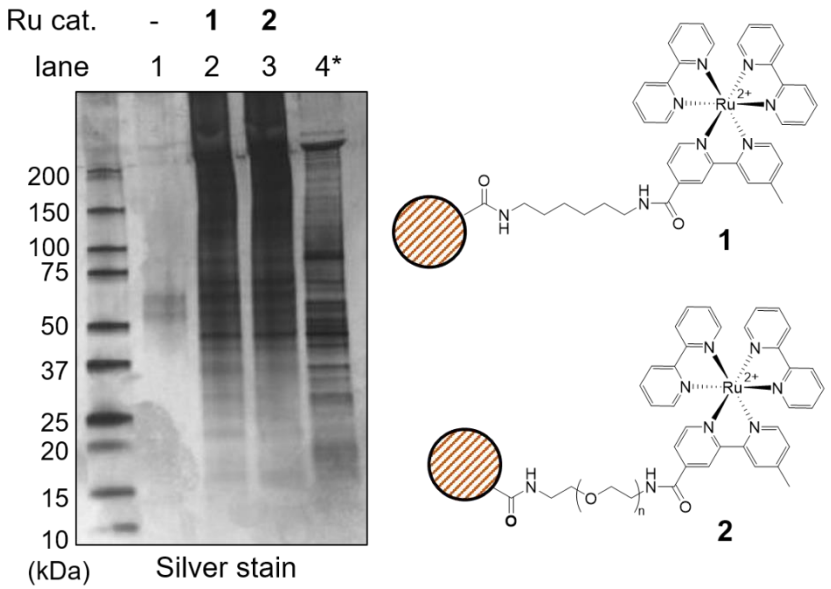
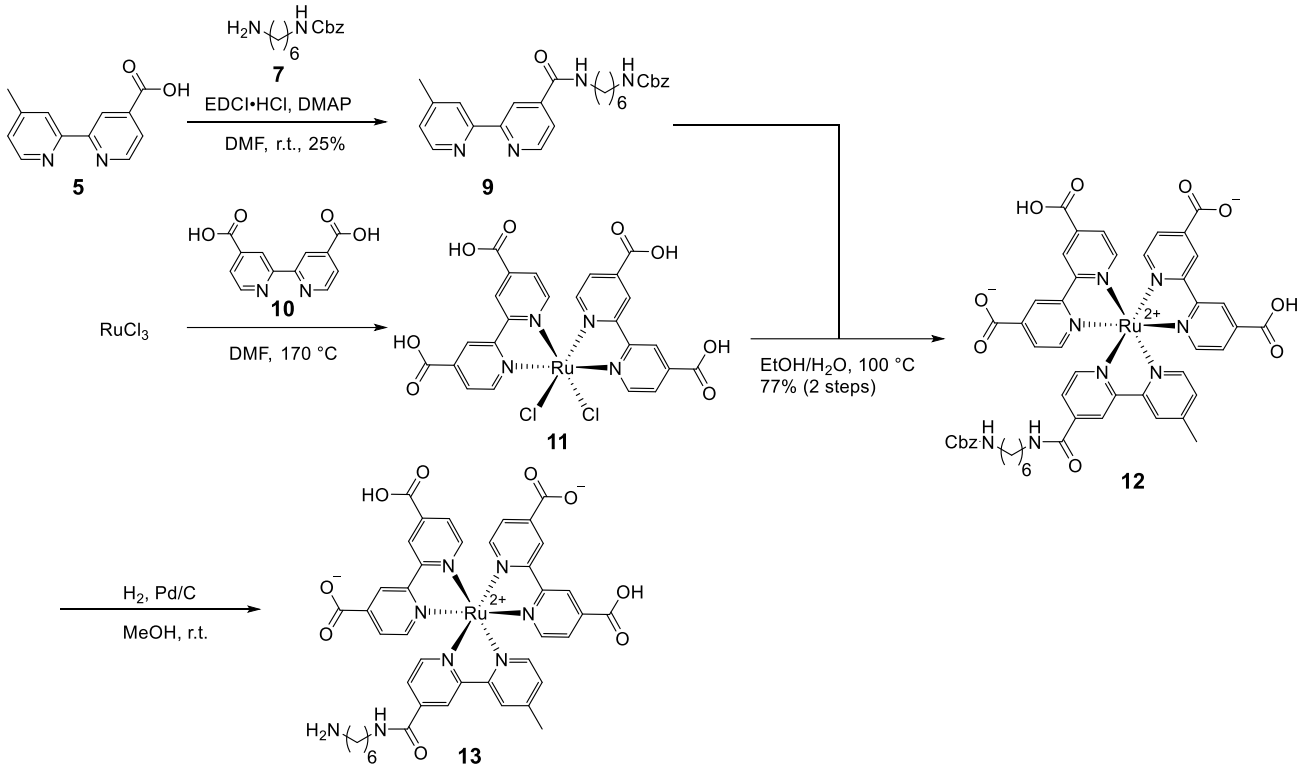


Figure 2-3. Ru 光触媒担持ビーズに吸着したタンパク質量の評価 *Input: HeLa 細胞破砕液（0.1 mg/mL proteins）

2-3-3. アニオン部位を含有した Ru 光触媒の合成

前節で述べたようにアニオンを含有した Ru 光触媒を合成することで Ru の持つ 2+の正電荷を中和し、非特異的なタンパク質吸着を改善しようと考えた。そのための具体的な分子設計として、配位子構造にカルボン酸を有した Ru 光触媒の合成を計画した。カルボン酸から生じるカルボキシラートが Ru の持つ 2+の電荷を中和することを期待した。配位子構造に複数のカルボキシル基を有する Ru 光触媒誘導体 **13** の合成法を Scheme 2-3 に示した。$RuCl_3$ に対して 2 当量の 4,4'-dicalboxy-2,2'-bipyridine (dcbpy) **10** を配位させることで $Ru(dcbpy)_2Cl_2$ **11** を合成し、リンカー**7** をあらかじめ導入した配位子 **9** と反応させることによって Ru 錯体誘導体 **12** を得た。Ru 錯体 **12** の Cbz 基を水素添加反応によって脱保護することで目的の Ru 光触媒誘導体 **13** を得た。



Scheme 2-3. アニオン含有 Ru 光触媒 **13** (Ru/dcbpy 錯体) の合成

2-3-4. Ru 光触媒 13 担持ビーズの作製

2-3-2 節と同様の手法で Ru 光触媒 **13** 担持ビーズを作製した。しかしビーズ上の未反応の NHS エステルをクエンチするキャッピングの段階において上清が Ru 光触媒に由来するオレンジ色に着色したため、上清の MALDI-TOF MS 解析を行った。キャッピング剤として用いる 2-アミノエタノールが Ru 光触媒 **13** と配位子交換反応することにより Ru 錯体 **14** の生成が示唆された（Figure 2-4）。

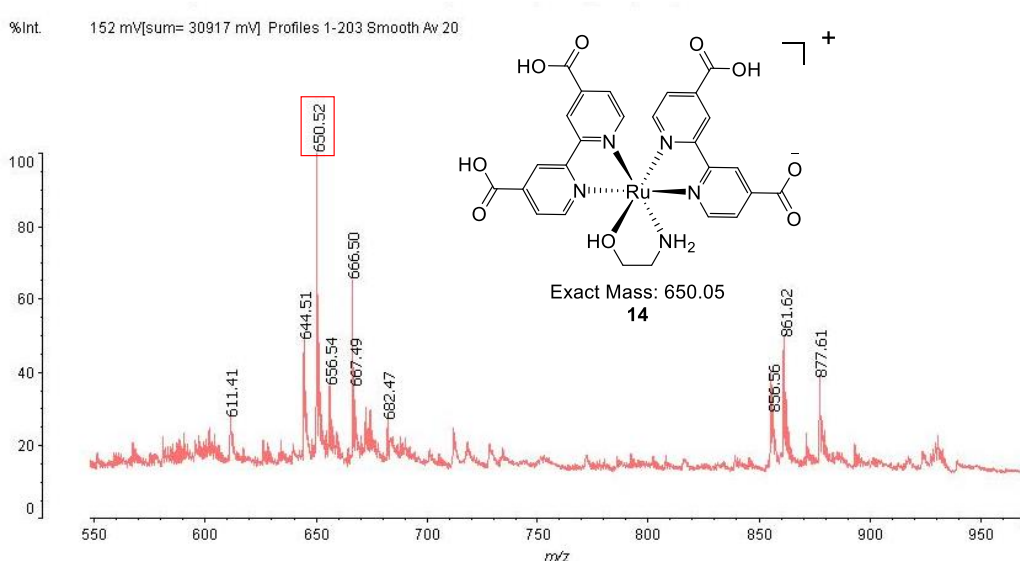
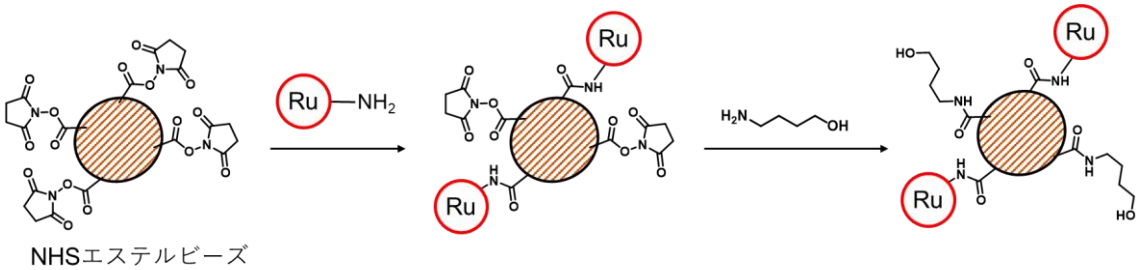


Figure 2-4. Ru 光触媒 **13** 担持ビーズと 2-アミノエタノールによるキャッピング反応後の上清の MALDI-TOF MS 解析と生成した錯体 **14** の推定構造

おそらく dcbpy の配位力が従来までの bpy と比較して低下していること、および 2-アミノエタノールがキレート剤となることが Ru 錯体 **14** の生成に関わっていると予想した。キレート構造は金属-配位子間で 5 員環や 6 員環を形成する際に形成される。そこでキャッピング剤を 4-アミノ-1-ブタノールへ変更しビーズの調製を行った（Scheme 2-4）。4-アミノ-1-ブタノールは仮にキレートを形成した場合 7 員環となり不安定であるためキレートの形成がほとんど起こらず、実際に上清に対する着色も軽減された。



Scheme 2-4. Ru 光触媒担持ビーズ調製法の改良

2-3-5. Ru 光触媒 13 担持ビーズのタンパク質吸着性とビーズ表面電位の相関

調製した Ru 光触媒担持ビーズに対するタンパク質吸着性を 2-3-2 節と同様の方法で評価した（Figure 2-5）。Ru 光触媒 **1** 担持ビーズでは多くのタンパク質吸着が起こる一方で、Ru 光触媒 **13** 担持ビーズの場合にはほとんどタンパク質を吸着していないことが明らかとなった。

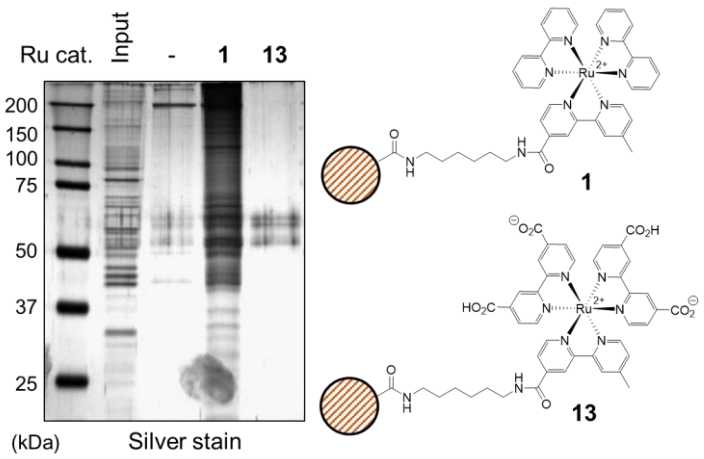
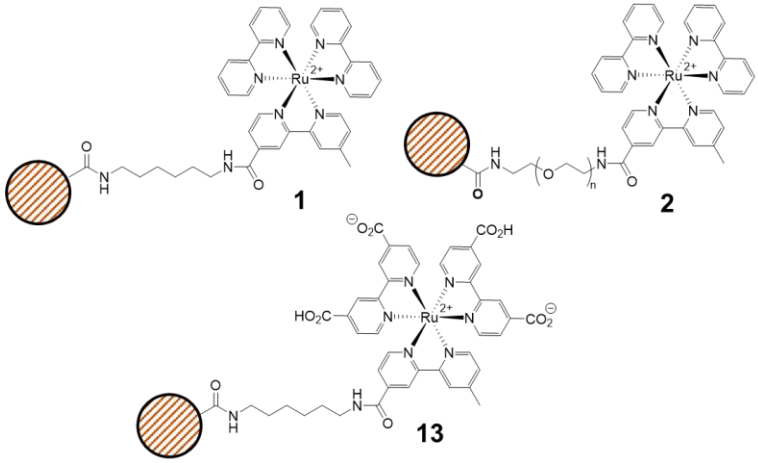


Figure 2-5. Ru 光触媒 **1**, **13** 担持ビーズに吸着したタンパク質量の評価 Input: HeLa 細胞破砕液（0.1 mg/mL proteins）

この Ru 光触媒担持ビーズのタンパク質吸着性と錯体の持つ電荷の相関を調べる目的で、Ru 光触媒担持ビーズの表面電位を動的光散乱（DLS）測定により評価した（Figure 2-6）。Ru 光触媒 **1**, **13** を担持したビーズは担持していないビーズと同等の粒径を示した。一方で Ru 光触媒 **2** 担持ビーズでは 100 nm ほど Ru 光触媒を担持していないビーズと比較して粒径が大きくなった。リンカーに用いている PEG リンカーは Ru 光触媒 **1**, **13** と比較して長くなっているものの、粒径を直径約 2 nm 程度変化させる程度のリンカー長の違いである。おそらくリンカー構造の違いによってビーズ内部への溶媒の取り込みやすさ、すなわち溶液中での膨潤のしやすさに影響を与えるものであると考えられる。また、表面電位を比較すると、Ru 光触媒を担持していない場合と比較し、Ru 光触媒 **1**, **2** 担持ビーズでは、Ru の正電荷に由来するビーズの表面電位の上昇が観測された。Ru 光触媒 **1** を担持したビーズは+29.1 mV、**2** では+23.9 mV、**13** では+9.42 mV というゼータ電位を示し、Ru 光触媒の正電荷は **1** > **2** > **13** と減少していくことがわかった。Ru 光触媒 **2** では PEG リンカーの持つ酸素原子の持つ部分負電荷による中和が起こったのではないかと考察している。カルボキシラートを含有する Ru/dcbpy 光触媒 **13** においては表面電位の大幅な減少が観測されている。このことから作業仮説通り Ru/dcbpy 光触媒 **13** は、その正電荷を中和することによってタンパク質の非特異的な吸着を解消したことが裏付けられた。



Ru cat.	Diameter [nm]	Zeta-potential [mV]
-	261.7	+14.2
1	272.9	+29.1
2	357.9	+23.9
13	262.8	+9.42

Figure 2-6. Ru 光触媒担持ビーズの DLS 測定結果

2-4. Ru/dcbpy 光触媒のラベル化触媒能の評価

2-3 節ではタンパク質の非特異的な吸着の少ない Ru/dcbpy 光触媒を開発した。しかし、配位子構造の変化による分光学的性質やラベル化触媒能の変化については未知数である。そこで Ru/dcbpy 光触媒について、配位子構造の変化による物性・ラベル化触媒能の変化を調べることとした。

2-4-1. Ru/dcbpy 光触媒の物性評価

まず Ru/dcbpy 光触媒の持つ吸収波長を評価することとした。ここでは、より安定性の高い Ru 光触媒 **1**, **13** のアミノ基保護体 **15**, **12** について物性を評価した。$Ru(bpy)_3Cl_2$ では既報の文献[3]通り 430 nm と 460 nm 付近に Ru^{2+} と bpy の金属-配位子間の遷移（MLCT 遷移）に由来する吸収が観測された（Figure 2-7）。誘導体 **15**, **12** についても同様の吸収が観測されたことから、配位子の構造変換による可視光吸収の変化は差異がなく、従来と同等の波長で Ru 光触媒誘導体 **15**, **12** を励起可能であることが示された。

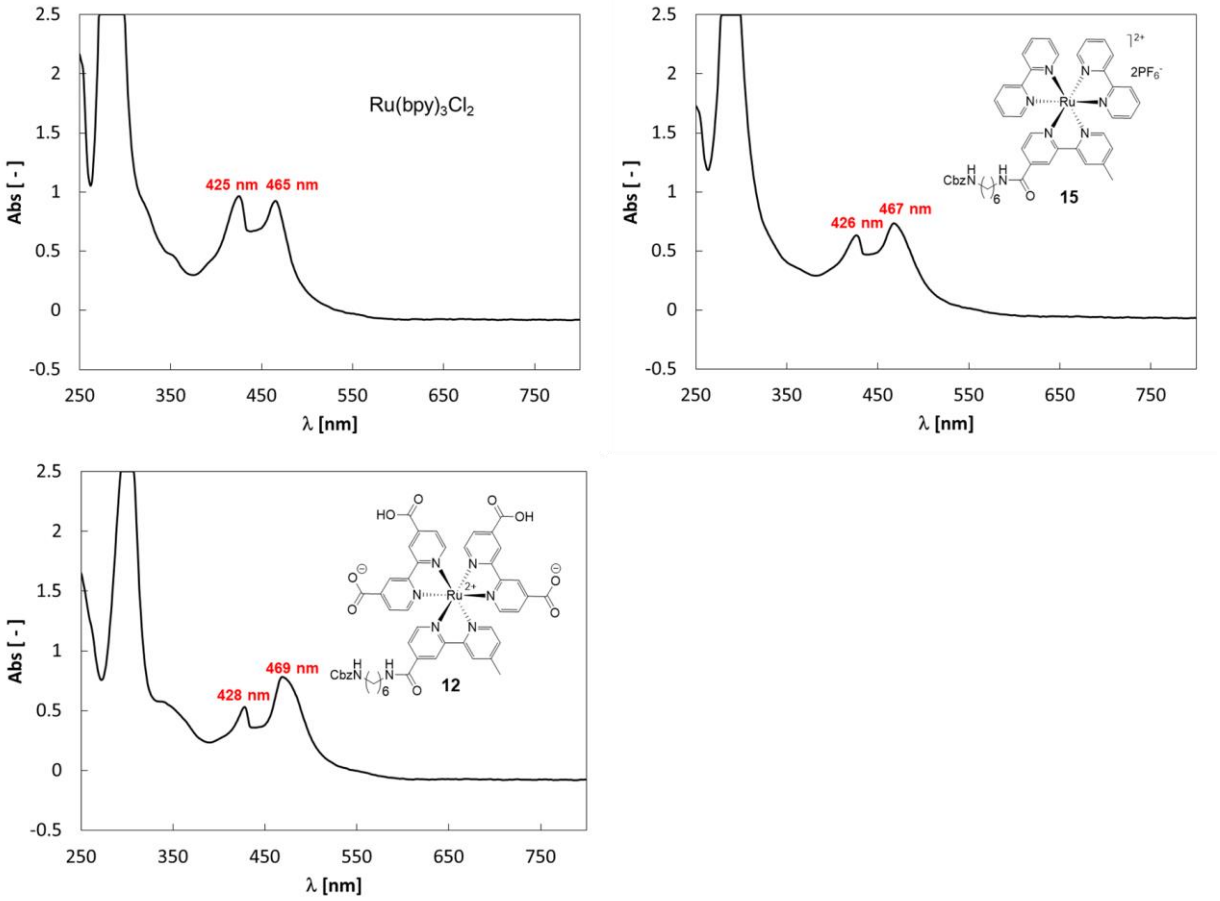


Figure 2-7. Ru 光触媒誘導体の吸光度

さらに、Ru 光触媒誘導体の酸化還元電位をサイクリックボルタンメトリー（CV）によって評価することとした。序論で本ラベル化反応の機構を述べたが、CV 測定によって Ru(III) のもつ SOMO のエネルギー準位を見積もることができる。つまり Ru(III)が電子を受け取る軌道のエネルギー準位が分かるため、測定した Ru 光触媒がどのような HOMO を持つ化合物から一電子を受け取ることができるか明らかにすることができる（Figure 2-8）。

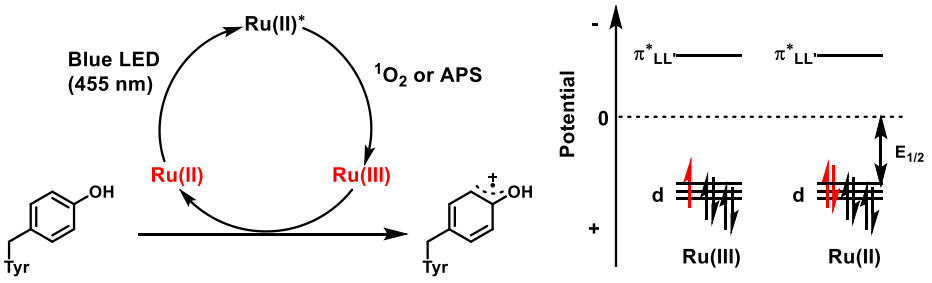


Figure 2-8. 本反応機構と Ru(II)および Ru(III)の電子配置

実際に光反応を行う水溶媒中での酸化還元電位を調べるため、既報の文献 [4] を参考にリン酸緩衝溶液 (pH 7.4)を溶媒とし、化合物を溶解させる目的で DMSO を 10%添加した条件で測定を行った（Figure 2-9）。測定の結果、配位子の構造変換がされていない $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$、配位子構造に 1 つアミドが導入された **15** および配位子構造に 1 つのアミドと 4 つのカルボン酸が導入された **12** は $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$ < **15** < **12** の順、すなわち電子求引基の増加に伴い、酸化還元電位がわずかに正方向にシフトしていることが明らかとなった。より正電荷側に酸化還元電位をもつということは、酸化力が向上していることを意味する [5]。また、チロシンの酸化還元電位はいずれの Ru 触媒の酸化還元電位よりも小さい値をとっている。これは、いずれの Ru 光触媒においてもチロシンを一電子酸化することが可能であることを示している。以上の分光学的・電気化学的な測定から、合成した Ru 光触媒誘導体は、可視光励起条件下、チロシン残基を一電子的に酸化できることが示唆された。

Compound	Redox potential($E_{1/2}$) V vs. Ag/AgCl
$Ru(bpy)_3(PF_6)_2$	1.16
15	1.19
12	1.22
Tyr	0.79

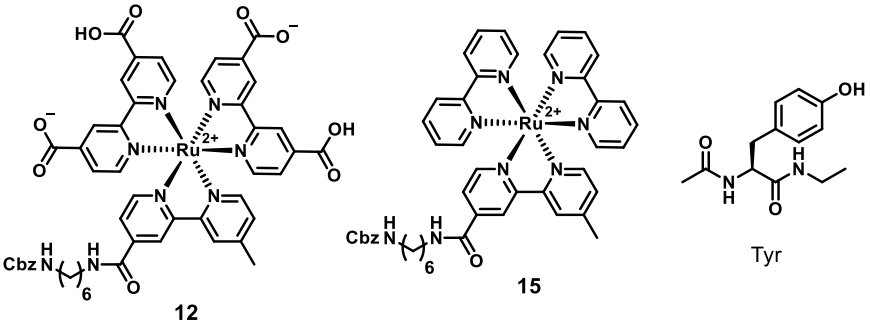


Figure 2-9. Ru 光触媒誘導体の酸化還元電位

2-4-2. Ru/dcbpy 光触媒のラベル化触媒能の評価

前節より、合成した Ru/dcbpy 光触媒は可視光励起条件下、ラベル化反応を触媒するために十分な一電子酸化触媒能を有していることが示唆された。そこで、実際にペプチド・タンパク質に対してラベル化反応を行うこととした。1 つのチロシン残基を有するペプチドである Angiotensin II をモデルペプチドとし、5 当量のラベル化剤（tyrosyl radical trapping agent: TRT）と 10 当量の Ru 光触媒およびペルオキソ二硫酸アンモニウム（APS）存在下、光反応を行った。反応後のペプチドは MALDI-TOF MS 測定によって反応効率を評価した（Figure 2-10）。いずれの Ru 光触媒を用いた際にも Angiotensin II のピーク（m/z [M+H$^+$] = 1046）が消失し、モノラベル化体のピーク（m/z [M+H] = 1222）やビスラベル化体のピーク（m/z [M+H$^+$] = 1396）が観測されたことから、ラベル化反応の進行が示唆された。$Ru(bpy)_3Cl_2$ や、Ru 触媒 **15** を用いたときには 2 つの TRT が結合したビスラベル化体のピークが強く見られるが、Ru/dcbpy 光触媒 **12** を用いたラベル化ではそのピークの強度が弱くなっていることから、Ru/dcbpy 光触媒 **12** ではそのラベル化効率がやや低下していることも示唆された。

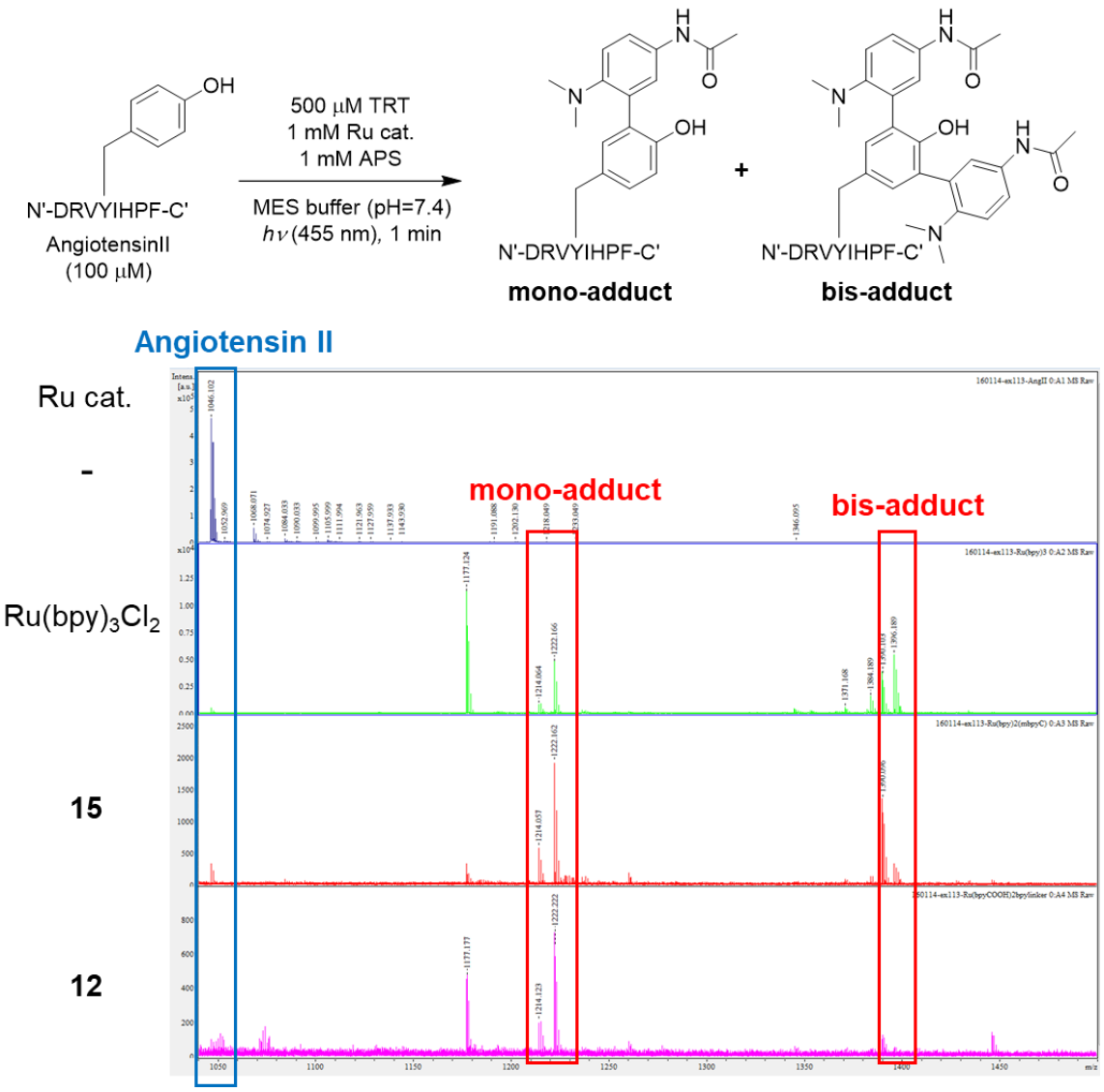


Figure 2-10. Ru 光触媒誘導体を用いた Angiotensin II のチロシン残基ラベル化

次にタンパク質に対してラベル化反応が進行するか調べることとした。ウシ血清アルブミン（BSA）をモデルタンパク質とし、ビオチンの構造を含有したラベル化剤（biotin-TRT）を用いて光反応を行った。ラベル化した BSA は、ウェスタンブロットを行った後にストレプトアビジン HRP で処理し、化学発光の強度を比較することで、BSA に結合した biotin-TRT の量を評価した(Figure 2-11)。いずれの Ru 光触媒を用いた際にも BSA に対する biotin-TRT の結合が確認された。しかし、その結合量は、$Ru(bpy)_3Cl_2$ > **15** > **12** の順に低下することが示された。

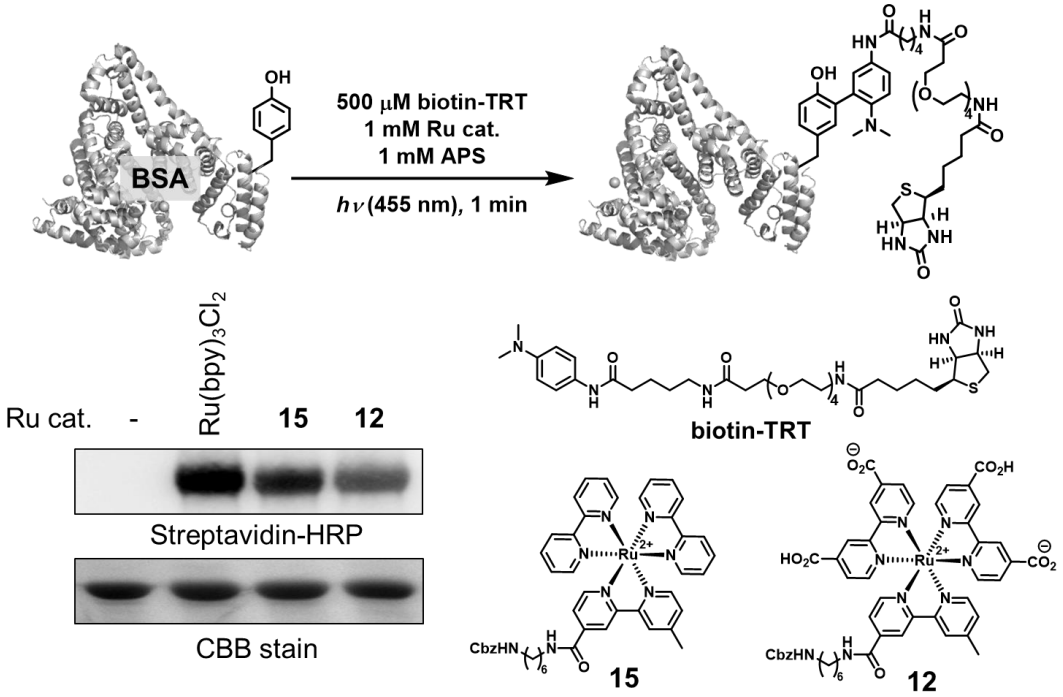


Figure 2-11. Ru 光触媒誘導体を用いた BSA へのチロシン残基ラベル化

以上のペプチドラベル化・タンパク質ラベル化の結果は、Ru/dcbpy 光触媒 **12** がタンパク質のチロシン残基ラベル化能を保っていることを裏付けるものである。以上のことから、タンパク質の非特異的な吸着の少ない、チロシン残基ラベル化触媒 Ru/dcbpy 光触媒を見出すことに成功した。

2-5. Ru 光触媒担持アフィニティービーズのタンパク質精製能の評価

前節までで、タンパク質の非特異吸着の少ないタンパク質ラベル化触媒 Ru/dcbpy 光触媒を見出すことに成功した。そこで、Ru 光触媒担持ビーズを用いた標的タンパク質の精製・ラベル化の検討を行うこととした。まず、Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いて標的タンパク質を選択的に精製することができるか検証することとした。モデルタンパク質炭酸脱水酵素（Carbonic Anhydrase : CA、MW : 29 kDa）を選定した。NHS エステルで表面修飾された FG ビーズに対して Ru 光触媒 **1**, **2**, **13** のいずれかと CA のリガンド 4-sulfurmoylbenzoic acid の誘導体 **16** を同時に担持した（Figure 2-12a）。リガンドおよび Ru 光触媒の担持量を反応後の上清の吸光度測定により求めたところ **1**: 17 nmol/mg、 **2**: 16 nmol/mg、 **13**: 31 nmol/mg、**16**: 24 nmol/mg となった。Ru/dcbpy 光触媒 **13** のみ担持率が高いものの、他の Ru 光触媒とリガンドの担持量に大きな差異はないことがわかった。さらに、Ru 光触媒 **13** 担持ビーズの形状を透過電子顕微鏡（TEM）により観測したところ、Ru 光触媒担持ビーズの構造は、報告されている FG ビーズの構造[2]と差異がないこともわかった（Figure 2-12c）。

このビーズを用いて HeLa 細胞破砕液中に混ぜた CA の精製を行った（Figure 2-12b）。リガンド **16** のみを担持したビーズでは CA を選択的に精製することに成功した（lane 3）。しかし、2-3 節で得られた知見通り、Ru 光触媒 **1** を同時に担持した際、CA 以外にも多くのタンパク質を非特異的に吸着した（lane 4, 5）。担持する Ru 光触媒を、**2**, **13** へと変更すると、タンパク質の非特異的な吸着は減少した（lane 6 - 9）。特に Ru 光触媒 **13** と **16** を同時に担持したビーズ（lane 9）ではリガンド **16** のみを担持した場合（lane 2）とほとんど差異が見られなくなった。以上のことから Ru/dcbpy 光触媒担持ビーズによって、一般的に用いられるアフィニティービーズと同等の選択性で標的タンパク質を精製することが可能となった。

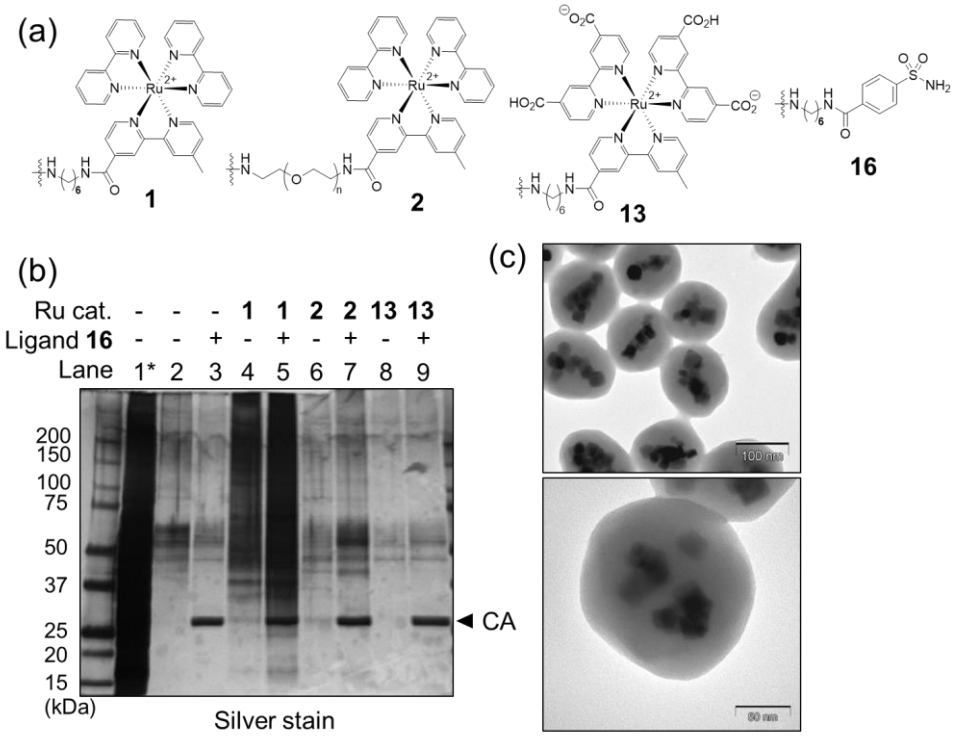


Figure 2-12. (a) 担持した Ru 光触媒およびリガンドの構造 (b) Ru 光触媒担持ビーズを用いた CA 精製 *Input : 1.0 μM CA in HeLa cell lysate (3.0 mg/mL proteins) (c) Ru 光触媒 **13** 担持ビーズの TEM 画像

2-6. Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いた標的タンパク質の精製およびラベル化

2-6-1. BSA, OVA, CA 混在系での標的タンパク質精製・ラベル化の検討

Ru/dcbpy 光触媒を用いることで標的タンパク質を選択的に精製できることを前節で示した。次に精製されたタンパク質に対してビーズ上でのラベル化反応が進行するか調べる目的で、Ru/dcbpy 光触媒担持ビーズを用いて精製した CA のラベル化反応を行った。牛血清アルブミン（BSA）、オボアルブミン（OVA）と CA の 3 種類の精製タンパク質を混合した溶液から CA の精製を行った後に、ラベル化剤 biotin-TRT および APS を添加して氷上で光照射を行い、biotin-TRT の結合量をストレプトアビジン HRP で処理することで評価した（Figure 2-13b）。光反応の際は、エッペンドルフチューブのフタを開け、光源をチューブの真上に設置し、サンプル溶液に対して至近距離で光を照射した（Figure 2-13c）。ビーズ上のリガンドの有無に関わらず BSA や OVA の非特異的な吸着は確認されず、リガンド **16** を担持している場合のみ CA を選択的に精製することに成功した（lane 3, 5）。さらに、Ru 光触媒 **13** およびリガンド **16** を同時に担持したビーズを用いた場合に、精製した CA をラベル化することに成功した（lane 5）。しかし、Ru 光触媒 **13** を担持していないビーズを用いてもわずかにラベル化反応が進行することがわかった（lane 2, 3）。これは APS による酸化的な副反応に由来していると考えている。また、いずれの lane においても分子量 50-70 kDa 付近に微量にコンタミネーションしたケラチンのバンドも現れてしまった。洗浄操作によって BSA や OVA は除けているにも関わらず、ケラチンが除けていないことから、FG ビーズの表面構造はケラチンを吸着しやすいということも示唆された。副反応の進行やケラチンの吸着は見られたものの、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて精製、ラベル化した場合には Ru 光触媒 **13** を担持していない場合よりも非常に高い効率で CA をラベル化している。このことから目的である Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質のラベル化を達成することができた。

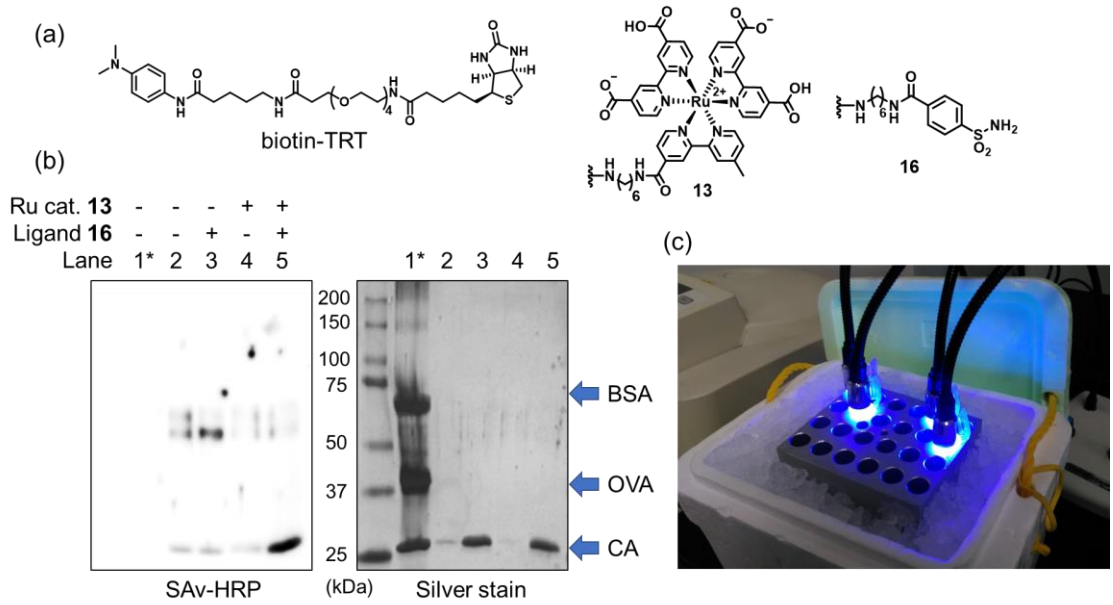


Figure 2-13. (a) biotin-TRT、Ru 光触媒 **13**、リガンド誘導体 **16** の構造 (b) Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズによる CA の精製・ラベル化（*Input : 1 μM BSA、1 μM OVA、1 μM CA in 10 mM MES buffer（pH 7.4））(c) 光照射の方法

2-6-2. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上のラベル化におけるリガンド効果の検証

この Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いたラベル化反応が、ビーズの表面上でリガンドとタンパク質の結合を駆動力として進行しているか確認するために、リガンド分子を反応系中に存在させビーズ表面上のリガンドと競合阻害が起こる条件下でラベル化反応を行った。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いてタンパク質混在系から CA を精製した後に、一方のサンプルはそのまま biotin-TRT および APS を添加し光反応を行った。もう一方のサンプルには CA のリガンド **17** を添加した後に同様の光反応を行った（Figure 2-14a）。もしビーズ表面上でリガンドに結合したタンパク質が選択的にラベル化されているのであれば、競合阻害が起こる条件ではラベル化反応が進行しなくなるはずである。実際に、競合阻害条件下では CA のラベル化効率が大きく低下することが明らかとなった（Figure 2-14b）。競合阻害をかけた際にもわずかに反応が進行しているのは、ビーズ上に偶発的に近接した CA がわずかながらラベル化を受けたためであると考えている。すなわち、ラベル化反応のほとんどはビーズ表面上でリガンドとの結合を駆動力として進行している。

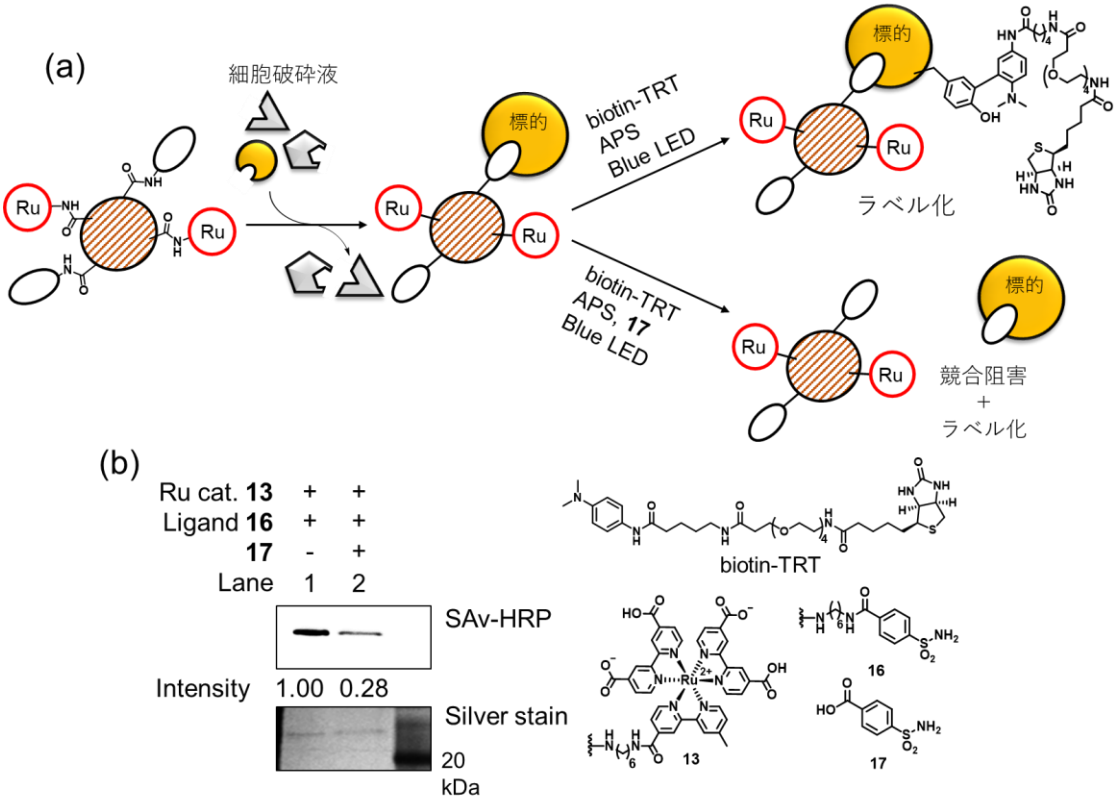


Figure 2-14. (a) 評価法の概略図 (b) 本手法で精製・ラベル化された CA（lane 1）および競合阻害を行いつつラベル化された CA（lane 2）

2-6-3. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上のラベル化におけるラベル化効率の評価

次に Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて精製・ラベル化した CA の回収効率およびラベル化効率を見積もることとした。回収効率は、各濃度の CA の銀染色のバンド強度を定量し、検量線を作成することで算出した（Figure 2-15b）。またヒト血清アルブミン（HSA）にはジスルフィド

結合を形成していないフリーのチオールを持つシステイン残基が一つだけ存在する。このシステイン残基にマレイミドを有するビオチンを結合させることで、一つだけビオチンが導入された HSA（HSA-biotin）を調製することができる。各濃度の HSA-biotin の発光強度を定量し検量線を作成することで、ラベル化された CA のラベル化効率を算出した（Figure 2-15c）。まず、本ビーズを用いた CA の回収効率は 61%であることがわかった。すなわち、およそ 4 割の CA が洗浄操作によって解離していることを示している。また、CA のラベル化効率は 0.5 biotin/CA であることがわかった。さらに、液相中で $Ru(bpy)_3Cl_2$ を光触媒として CA をラベル化した場合には 2.7 biotin/CA であることもわかった。すなわち、ビーズ上でのラベル化反応は液相中のラベル化反応に比べて効率が低下するという結果である。この要因は大きく 2 つ考えられる。一つ目は、本ラベル化反応は光が駆動力となるため、ビーズが光を遮蔽することによって反応効率が低下してしまうことである。二つ目は、液相中では光触媒が CA のあらゆる部位と接近しうるため、CA 表面上の全てのチロシン残基をラベル化することができるが、ビーズ上でのラベル化反応はリガンド結合ポケット付近に Ru 光触媒が近接するため、部位特異性が生じ、ほとんどラベル化反応を受けないチロシン残基も現れることである。このように、ラベル化効率の低下はみられるものの、一般的な光親和性標識法の標識化効率（数%程度）よりもラベル化効率は高く、高感度にリガンド結合タンパク質の検出が可能であると考えられる。

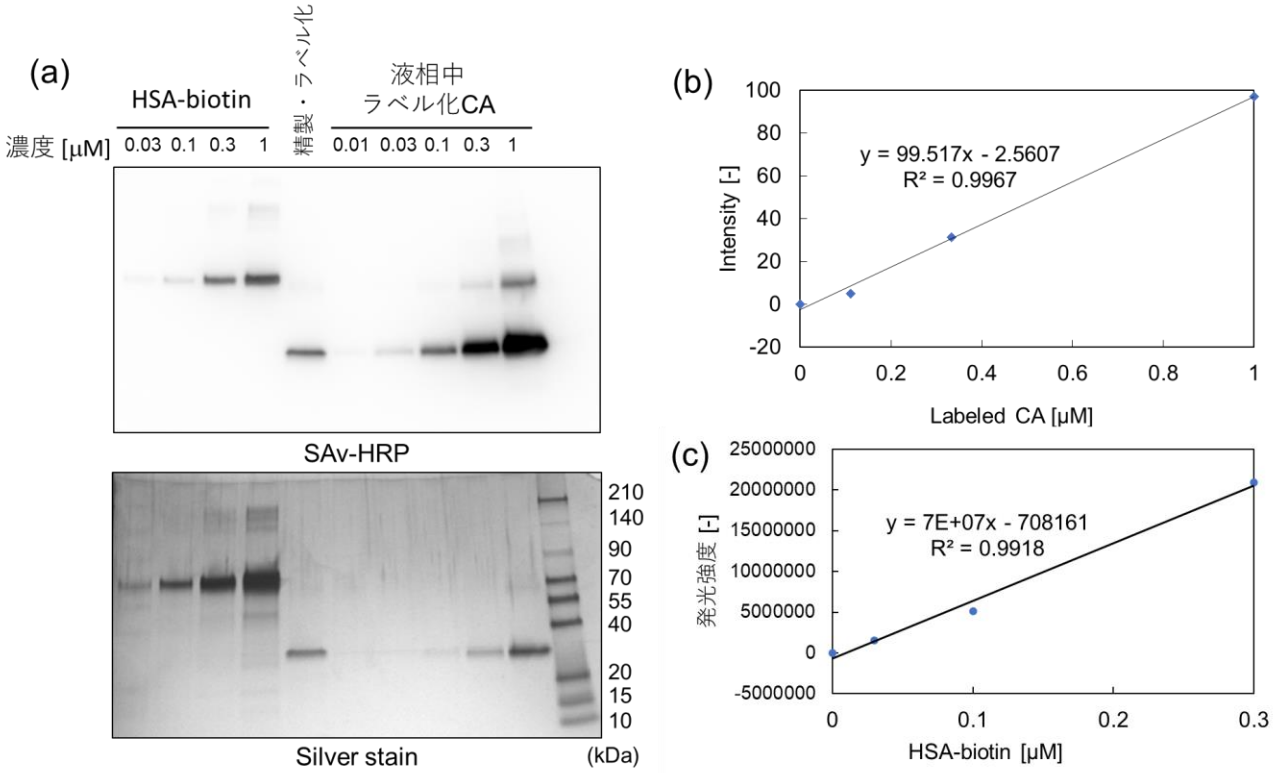


Figure 2-15. (a) ラベル化 CA および HSA-biotin のウェスタンブロットおよび銀染色（CA sample: Ru 光触媒 **13** およびリガンド **16** 担持ビーズを用いて精製・ラベル化した CA） (b) CA の銀染色バンド強度の検量線 (c) HSA-biotin の発光強度の検量線

2-6-4. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でラベル化された CA の酵素活性評価

Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いることでリガンド結合タンパク質を精製しつつ高効率にラベル化できることを前節で見出した。序論でも述べたとおり、Ru 光触媒によるチロシン残基ラベル化反応は可視光励起条件下、0 °C、5 分という温和な条件で進行するため、活性を保持しつつリガンド結合タンパク質をラベル化できると予想される。そこで、本手法で精製・ラベル化された CA の酵素活性測定を行うこととした。前節まででは、検出のみを目的としていたため熱変性を用いていたが、精製後のタンパク質の活性を測定するためにはリガンド結合タンパク質が変性する条件は避けなければならない。アフィニティークロマトグラフィーにおいて、ビーズ上からリガンド結合タンパク質を溶出する手法は主に次の 3 つが知られている。

Table 2-1. アフィニティークロマトグラフィーにおけるリガンド結合タンパク質の溶出法

溶出方法	特徴
・熱変性	加熱（95 °C、5 分）しタンパク質を変性させることで、リガンドとの結合を解離させ溶出する手法。最も回収効率が良い手法だが、溶出したタンパク質は変性しているため、用途はリガンド結合タンパク質の検出に限られる。
・競合	過剰量のリガンドを添加することによってビーズ上のリガンドからリガンド結合タンパク質を解離させる手法。解離したタンパク質には添加したリガンドが結合するため、活性評価等に用いる際にはリガンドを除去する工程が必要。
・塩溶出	酸性条件・塩基性条件に付す、もしくは、高濃度の塩を添加し溶出する手法。イオン的な相互作用によって、一時的にタンパク質の三次構造を不安定化させることでリガンドから解離させることが可能。

そこで、精製・ラベル化した CA の溶出方法は上記の中で最も温和な手法である塩溶出を用いることとした。CA は酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解反応を触媒することが知られており [9]、加水分解によって生じた *p*-ニトロフェノールの吸光度（340 nm）を測定することによって酵素の活性を評価することができる。そこで精製・ラベル化した CA の酵素活性を酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解反応によって評価した（Figure 2-16a）。

はじめに、Ru 光触媒を用いたチロシン残基ラベル化反応の条件によって、酵素がどの程度の割合で失活するか調べるため、ビーズを用いずに液相中で、$Ru(bpy)_3Cl_2$ を光触媒として biotin-TRT および APS を添加して光反応を行い CA のラベル化を行った。ラベル化された CA を用いて酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解反応を行い、反応溶液の 340 nm の吸光度を測定することで CA の活性を評価した（Figure 2-16b）。液相中の光反応でラベル化された CA はラベル化を受けていない CA と比較しておよそ半分程度活性が低下することが明らかとなった。次に Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて biotin-TRT による CA のラベル化を行った。ラベル化した CA の活性は、精製のみを行った CA の活性と比較することで評価した（Figure 2-16c）。前述した手法で酵素活性を評価したところ、液相中のラベル化反応では活性の低下が見られた一方で、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でラベル化された CA は酵素活性をほぼ 100%保持していることが明らかとなった。

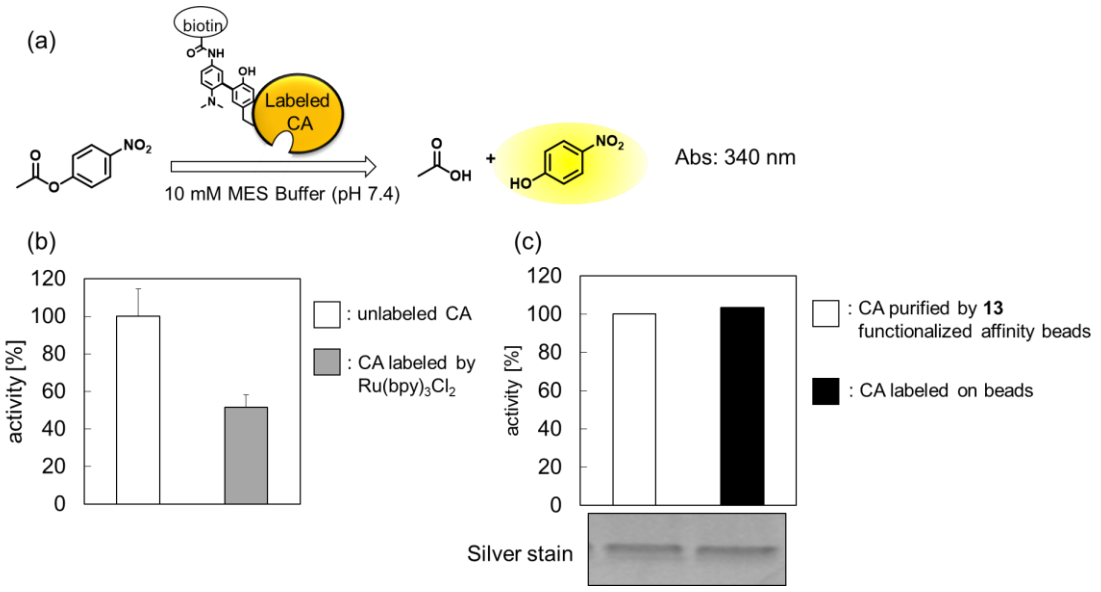


Figure 2-16. (a) CA の酵素活性評価方法 (b)液相中で $Ru(bpy)_3Cl_2$ を光触媒としてラベル化した CA の活性 (c) Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて CA を精製・ラベル化した CA の活性

$Ru(bpy)_3Cl_2$ を光触媒として用い液相中でラベル化した場合は酵素活性が低下するにも関わらず、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でラベル化を行った場合は活性が保持される理由は 2 つの要因が考えられる。まず 1 つ目は、前節で明らかとした Ru 光触媒を用いたラベル化効率に起因すると考えている。液相中でラベル化した際には 1 つの CA に 2.7 分子の biotin-TRT が反応しているものの、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いたラベル化では 1 つの CA に 0.5 分子の biotin-TRT しか反応していない。すなわち、液相中では過剰にラベル化が進行しており、CA の活性ポケットもしくはポケット周辺でのラベル化も進行する。このラベル化は基質が活性ポケットに入るのを阻害するため酵素活性の低下につながったと考えている。2 つ目の要因は、アフィニティービーズ上でのラベル化においては、CA の活性ポケットが保護されているためではないかと考えている。アフィニティービーズ上では CA の活性ポケットにはリガンド **17** が結合している。これによって、光反応時に CA の活性ポケットへ biotin-TRT が接近しないため、活性ポケットやポケット周辺でのラベル化が進行せず、酵素活性が保持されたという要因である（Figure 2-17）。

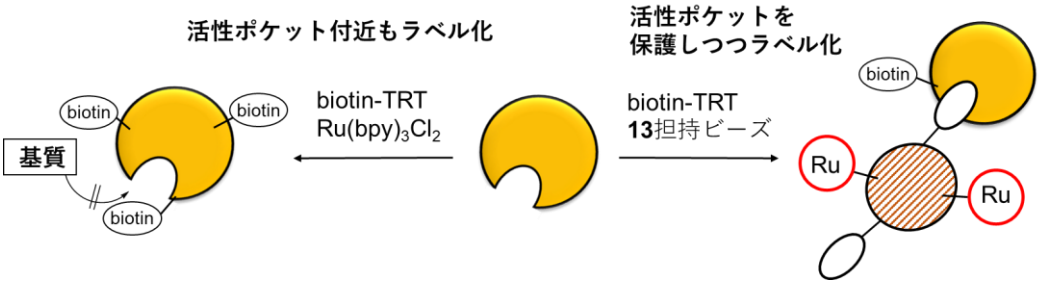


Figure 2-17. ビーズ上でのラベル化と液相中でのラベル化の違い

2-6-5. Ru 光触媒担持アフィニティービーズの再利用検討

本ラベル化反応は可視光励起条件下、0 °C、5 分という温和な条件で進行することから、タンパク質の活性を損なわずに精製・ラベル化が可能であることを示した。担持しているリガンドや光触媒も本反応条件では活性を損なわずに再利用できるのではないかと考えた。本手法で用いる Ru 光触媒担持アフィニティービーズは磁気により回収可能であるため、担持している触媒やリガンドが失活していなければ再利用が可能である。そこで、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを再利用した場合にもリガンド結合タンパク質を精製・ラベル化できるか評価することとした。HeLa 細胞破砕液中に CA を混在させたタンパク質溶液を用い、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて CA を精製後、biotin-TRT および APS を添加し光反応を行った。また、結合タンパク質の検出に汎用される溶出法である熱変性（95 °C, 5 min）を用いてビーズからラベル化されたタンパク質の溶出を行った場合、ビーズもしくはリガンドの失活が懸念される。さらに、熱変性に用いる Sample Buffer 中の 2-メルカプトエタノールは配位能の高い S 原子を含んでいるため Ru 触媒の分解も懸念される。以上のことから、熱変性よりも温和な条件である競合溶出を用いてラベル化された CA を溶出し、ビーズを洗浄後、回収したビーズを用いて再度同様の操作を行った。ラベル化された CA は、前節までと同様にストレプトアビジン HRP で処理することで検出した（Figure 2-18）。

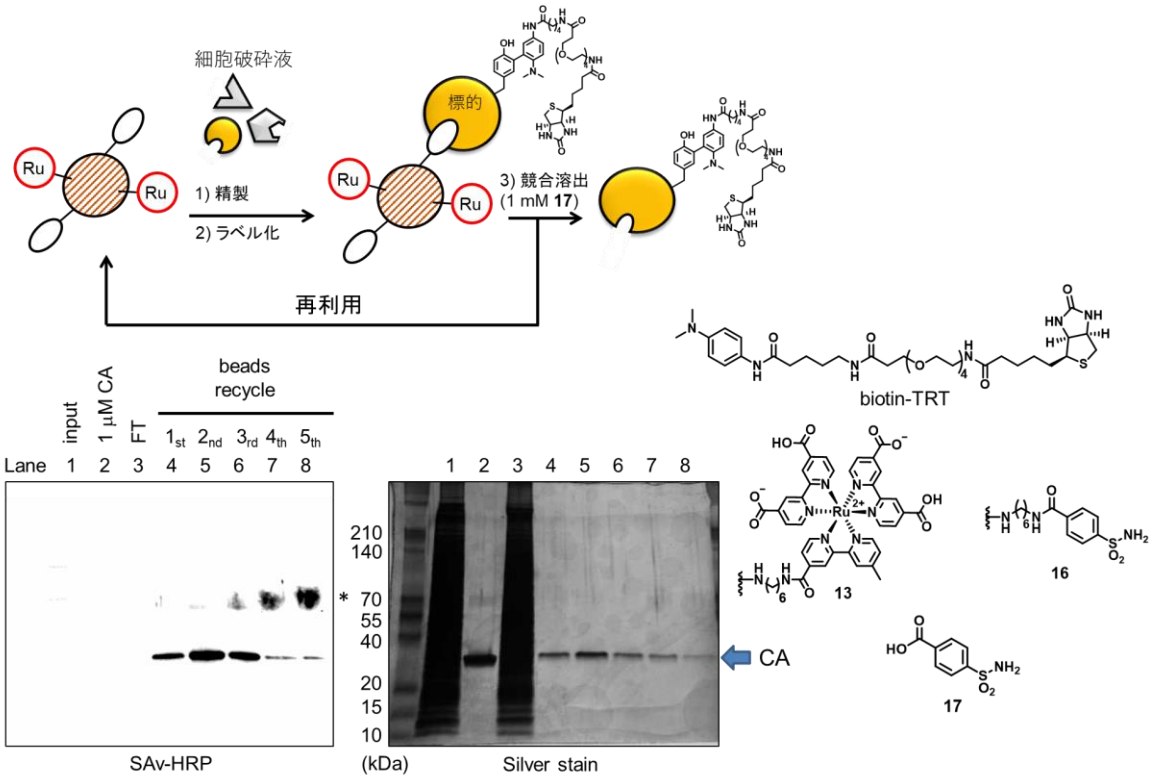


Figure 2-18. 再利用した Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いた場合の精製効率・ラベル化効率の評価（FT: Flow Through）

本ビーズは再利用してもリガンド結合タンパク質を精製・ラベル化できることがわかった（lane 4-8）。3 回目までの再利用ではタンパク質の精製効率やラベル化効率を損なうことなく精製・ラベル化することができた。Ru 光触媒はラベル化のみでなく一重項酸素を生成する光増感剤としての機能を持つ。そのため繰り返し使用していくにつれ、触媒の失活やリガンドの酸化失活を防ぐことはでき

ず、4 回目、5 回目以降の再利用ではタンパク質の精製効率・ラベル化効率をともに損なうことが分かった。しかしながら本検討によって、Ru 光触媒担持ビーズが触媒的に機能していること、3 回程度までなら再利用ができることが示された。

2-7. 内在性の微量タンパク質を標的とした標的タンパク質の精製・ラベル化

前節まででは、細胞破砕液中にモデルタンパク質を添加するという疑似的な実験系で本手法のコンセプト証明を行ってきた。本節では実際に細胞破砕液から内在性の標的タンパク質を精製しつつラベル化することができるか検証することとした。標的としてがん分子標的の一つであるジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）を選定した。DHFR のリガンドとしてメトトレキサート（MTX）が知られている [10]。実際に MTX のアミノ化誘導体 **18** を FG ビーズに固定化し、DHFR を精製した例が報告されている [2]。そこで Ru 光触媒 **13** およびリガンド **18** を担持したアフィニティービーズを作製し、DHFR の精製・ラベル化を検討した。ビーズ表面が NHS エステルで表面修飾された FG ビーズに対してリガンド **18** および Ru 光触媒 **13** の固定化を行った。2-8 節で Ru 光触媒の固定化率を固定化反応後の上清の吸光度から見積もったところ 31 nmol/mg となった。リガンド **18** についても、固定化反応後の上清の吸光度から固定化率を見積もったところ 8.0 nmol/mg となり、リガンド **18** は Ru 光触媒 **13** と比べると固定化率がおよそ 1/4 まで低下していることがわかった。リガンド **18** の固定化効率が低い要因として、メトトレキサートの低い溶解性が挙げられる。固定化反応に用いる溶媒の DMF に対する溶解度が低く、実際に溶解している MTX の濃度が低くなることで反応速度が低下し、このような値を示したと考察している。リガンド **18** よりも Ru 光触媒の方が過剰に固定化されている条件となっているが、本ビーズを用いて HeLa 細胞破砕液から DHFR の精製を試みた。リガンド **18** のみを固定化しているビーズと Ru 光触媒 **13** とリガンド **18** を同時に固定化したビーズのどちらを用いてもほぼ同量の DHFR を精製することに成功した（Figure 2-19）。さらに Ru 光触媒 **13** 固定化アフィニティービーズを用いて DHFR を精製後、biotin-TRT および APS を添加し光反応を行った。ストレプトアビジン HRP を用いて biotin-TRT が結合したか評価したところ、DHFR へのラベル化反応の進行が確認された。

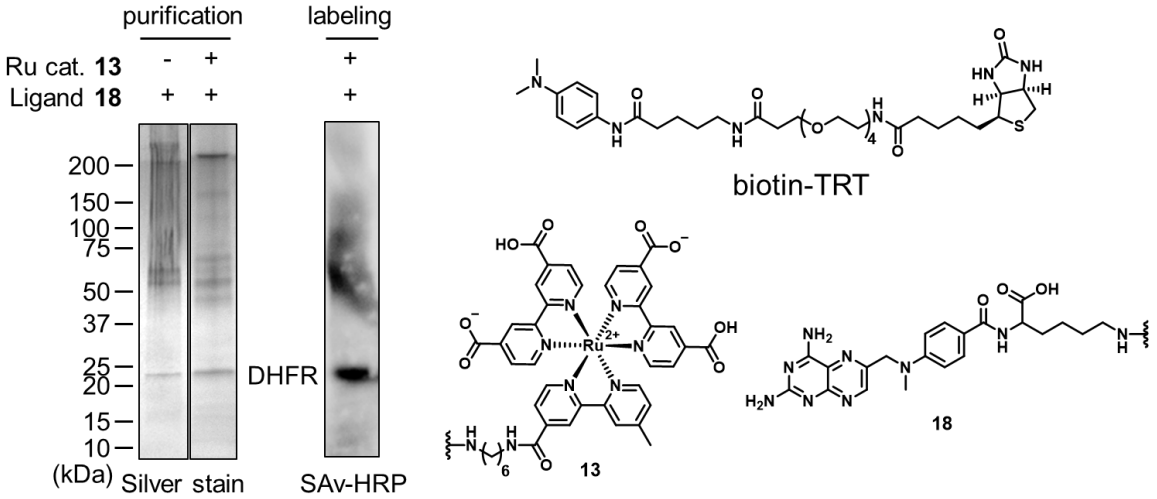


Figure 2-19. Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いて精製・ラベル化した DHFR

さらに、精製・ラベル化した DHFR を高感度に検出できるか検証することとした。一般的に化学発光による検出は銀染色よりも感度が高いため、biotin-TRT によるラベル化とストレプトアビジン HRP の化学発光の検出を用いれば、銀染色では検出できない微量の結合タンパク質も検出できると期待した。HeLa 細胞破砕液中の DHFR を精製後、先程と同様の条件で biotin-TRT によるラベル化を行った。ラベル化後の溶液を希釈していき、銀染色よりも感度よく DHFR を検出できるか検証した。

すると、lane 5 に示すように銀染色で検出できない微量の DHFR も、本手法で修飾することで検出が可能になった（Figure 2-20a）。次に、希釈した細胞破砕液中から DHFR の精製、biotin-TRT によるラベル化を行った。銀染色では 3.0 mg/mL の細胞破砕液中から精製した場合にのみ DHFR を検出することができている。一方で、本手法で精製・ラベル化した場合にはいずれの濃度の細胞破砕液においても DHFR を検出することに成功した（Figure 2-20b）。

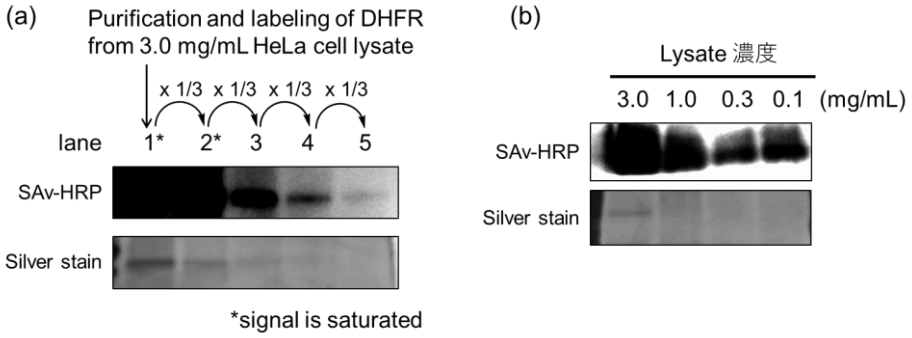


Figure 2-20. (a) 精製・ラベル化後に希釈した DHFR (b) 希釈した細胞破砕液中から精製・ラベル化された DHFR

2-8. 第二章のまとめ

アフィニティービーズ上での標的タンパク質のラベル化を達成するために、本章では、アフィニティービーズ上に担持するための Ru 光触媒誘導体 **1, 2, 13** を合成した。しかし、Ru 光触媒 **1, 2** では Ru のもつ 2+の正電荷に由来する非特異的なタンパク質の吸着を生じた。配位子構造にカルボキシル基を導入した Ru 光触媒 **13** では、カルボキシラートが Ru のもつ電荷を中和することによって非特異的なタンパク質の吸着を抑制し、高純度に標的タンパク質を精製することに成功した。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用い、細胞破砕液中の標的タンパク質の精製･ラベル化を行ったところ、一般的な光親和性標識法の反応効率を大きく上回る高いラベル化効率（50%）で精製したタンパク質選択的なラベル化を達成した。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でラベル化されたタンパク質は酵素活性を保持していた。磁気により回収したビーズを再利用した際、数回程度であればタンパク質精製能･ラベル化触媒機能の失活はみられなかった。本手法で精製・biotin-TRT によりラベル化されたリガンド結合タンパク質は、ストレプトアビジン-HRP を用いた発光検出を用いることで、従来法の銀染色では検出できないほど微量なタンパク質を検出可能にした。

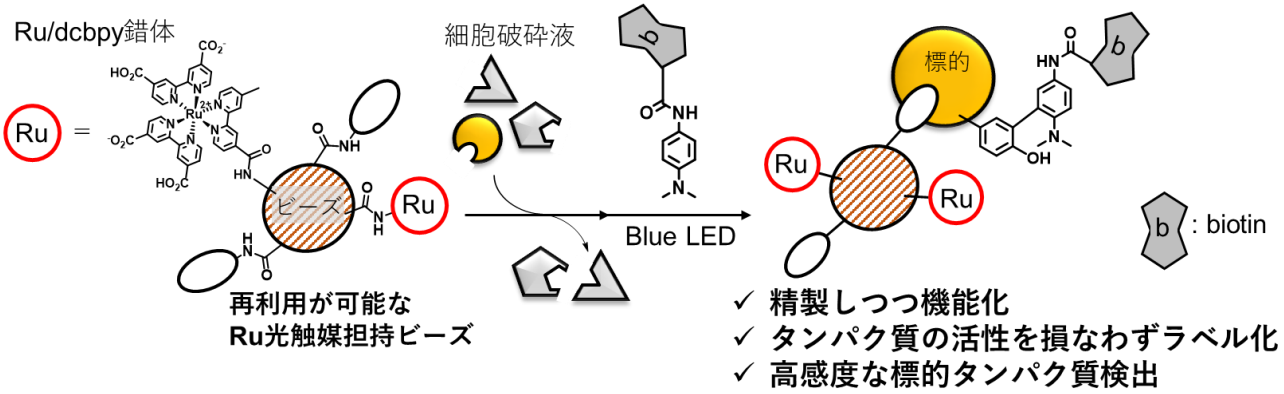


Figure 2-21. 第二章のまとめ

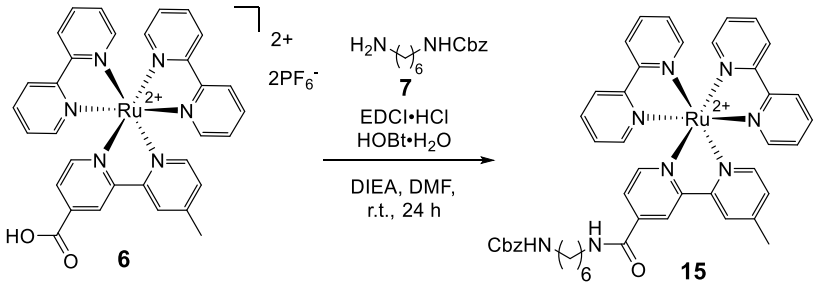
2-9. Reference

1. S. Sato and H. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013,** *52,* 8681-8684.
2. K. Nishio, Y. Masaike, M. Ikeda, H. Narimatsu, S. Tsubouchi, M. Hatakeyama, S. Sakamoto, N. Hanyu, A. Sandhu, H. Kawaguchi, M. Abe and H. Handa, *Colloids Surf., B* **2008,** *64,* 162-169.
3. A. Juris and V. Balzani, *Coord. Chem. Rev.* **1988,** *84,* 85-277.
4. (a) J. M. Kamdar, D. C. Marelius, C. E. Moore, A. L. Rheingold, D. K. Smith, D. B. Grotjahn, *ChemCatChem,* **2016,** *8,* 3045-3049. (b) H. C. Chen, J. N. H. Reek, R. M. Williams, A. M. Brouwer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016,** *18,* 15191-15198.
5. N. G. Connelly and W. E. Geiger, *Chem. Rev.* **1996,** *96,* 877-910.
6. S. Tachikawa, T. Miyoshi, H. Koganei, M. E. El-Zaria, C. Viñas, M. Suzuki, K. Ono, H. Nakamura, *Chem. Commun.* **2014,** *50,* 12325-12328**.**
7. A. W. Schwabacher, J. W. Lane, M. W. Schiesher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998,** *63*, 1727-1729.
8. H. Xia, Y. Zhu, D. Lu, M. Li, C. Zhang, B. Yang, Y. Ma, *J. Phys. Chem. B* **2006,** *110,* 18718-18723.
9. J. M. Armstrong, D. V. Myers, J. A. Verpoorte, J. T. Edsall, *J. Biol. Chem*. **1966,** *241,* 5137.
10. L. Genestier, R. Paillot, L. Quemeneur, K. Izeradjene and J. P. Revillard, *Immunopharmacology* **2000,** *47,* 247-257.

Experimental section

General. NMR spectra were recorded on a Bruker topspin ADVANCE III (500 MHz for ^{1}H, 125 MHz for ^{13}C) instrument in the indicated solvent. Chemical shifts are reported in units parts per million (ppm) relative to the signal (0.00 ppm) for internal tetramethylsilane for solutions in $CDCl_3$ (7.26 ppm for ^{1}H, 77.0 ppm for ^{13}C) or CD_3CN (1.94 ppm for ^{1}H, 118.26 ppm for ^{13}C). Multiplicities are reported using the following abbreviations: s; singlet, d; doublet, dd; doublet of doublets, t; triplet, q; quartet, m; multiplet, br; broad, *J*; coupling constants in Hertz. IR spectra were recorded on a JASCO FT/IR-4200 spectrometer. Only the strongest and/or structurally important peaks are reported as IR data given in cm^{-1}. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Bruker ESI-TOF-MS (micrOTOF II). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on a glass plate of silica gel 60 GF254 (Merck). Silica gel (Fuji Silysia, CHROMATOREX PSQ 60B, 50-200 μm) was used for column chromatography. Reverse phased column chromatography was performed with GL Science InertSep C18. Most commercially supplied chemicals were used without further purification. All chemicals and purified proteins for biological experiments were obtained from commercial sources and used without further purification.

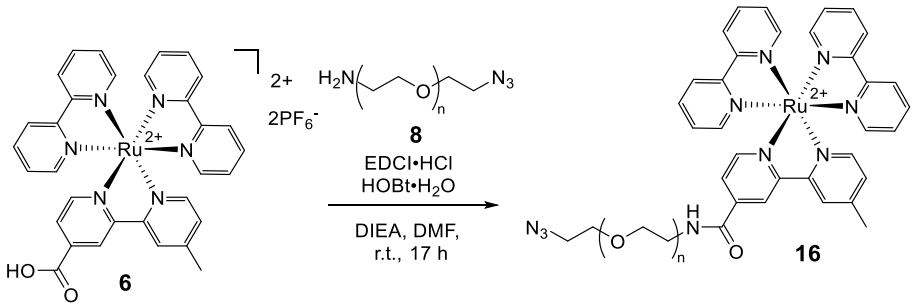
Synthesis of Compounds. *N*-(6-aminohexyl)-4-sulfamoylbenzamide (**16**), N^5-(Biotin-polyethyleneglycol)- N^1-[4-(dimethylamino)phenyl]glutaramide (biotin-TRT), Bis(2,2'-bipyridine)[4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carboxylicacid]ruthenium(II)bis(hexafluorophosphate) ($Ru(bpy)_2(mcbpy)(PF_6)_2$) (**6**)[1], N_3-PEG300-NH_2 (**8**)[7] and 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid (dcbpy, **10**)[8] were prepared according to the previously reported procedures.



Bis(2,2'-bipyridine){Benzyl[6-(4-methyl-2,2'-bipyridyl-4'-carboxyamido)hexyl]carbamate}ruthenium (II)bis(hexafluorophosphate) (15). To a solution of **6** (63.6 mg, 0.0693 mmol), EDCI·HCl (16.1 mg, 0.0840 mmol) and HOBt (12.2 mg, 0.0903 mmol) in 3.0 mL of DMF were added **7** (24.7 mg, 0.0861 mmol) and DIEA (10.0 μL, 0.0580 mmol). After stirring at room temperature for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in 5% MeCN/H_2O and purified with reverse-phase column chromatography (5-50% MeCN/H_2O) to give **15** as a red solid (58.9 mg, 74% yield).

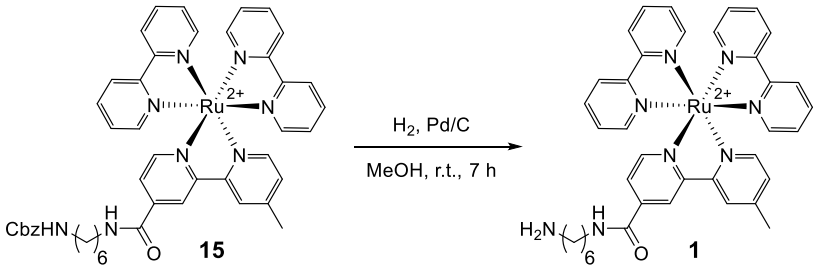
Mp >300 °C; ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ 8.82 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 8.07-8.04 (m, 4H), 7.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.73-7.69 (m, 4H), 7.65 (dd, *J* = 1.6 Hz, 5.8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.40-7.26 (m, 10H), 5.00 (s, 2H), 3.39-3.37 (m, 2H), 3.10-3.09 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.62-1.54 (m, 2H), 1.49-1.45 (m, 2H), 1.37-1.33 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN) δ 164.0, 158.8, 157.9, 157.8, 157.7, 157.4, 156.9, 153.2, 152.6, 152.5, 151.7, 151.6, 143.6, 138.8, 138.4, 129.6, 129.3, 128.7, 128.5, 126.4,

125.5, 125.2, 122.4, 66.6, 41.2, 41.1, 30.4, 29.7, 26.9, 21.2; FT-IR (KBr) 3423, 3338, 3112, 3082, 2936, 2862, 1773, 1675, 1604, 1543, 1466, 1202, 1136 cm^{-1}; HRMS (ESI, positive): *m/z* calced. for $C_{46}H_{46}N_8O_3Ru$ $[M]^{2+}$: 430.1369, found 430.1375.

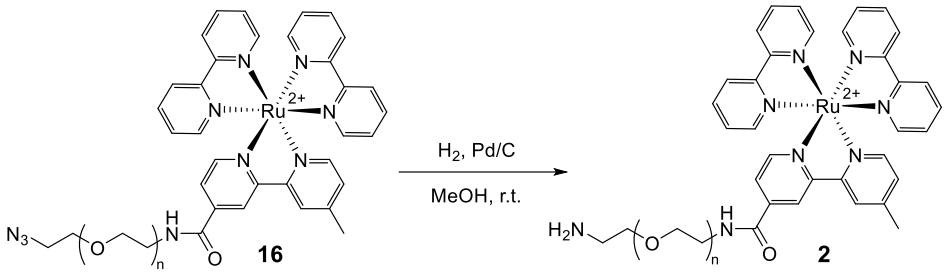


N_3-PEG300-Ru(bpy)$_3$ (16). To a solution of **6** (100 mg, 0.109 mmol), EDCI·HCl (42.3 mg, 0.238 mmol) and HOBt (31.1 mg, 0.230 mmol) in 5 mL of DMF were added **8** (124 mg, 0.404 mmol) and DIEA (32.3 mg, 0.250 mmol) under Ar. After stirring at room temperature for 17 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in 5% MeCN/H_2O and purified with reverse-phase column chromatography (5-40% MeCN/H_2O), and compound **16** was yield as a red amorphous solid (119 mg, 88% yield).

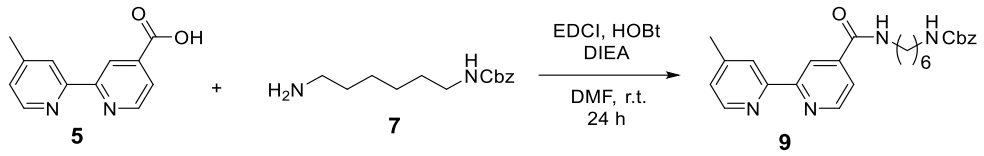
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ 8.93-8.86 (m, 1H), 8.60-8.56 (m, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 8.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.84 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.74-7.67 (m, 5H), 7.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.41-7.37 (m, 4H), 7.27 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.62-3.46 (m, 28H), 3.34-3.30 (m, 2H), 2.55 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN) δ 158.9, 157.9, 157.8, 157.7, 157.0, 153.2, 152.7, 152.6, 152.5, 151.7, 143.5, 138.8, 129.6, 128.6, 128.5, 126.6, 125.6, 125.5, 125.2, 122.6, 71.0, 70.9, 70.8, 70.3, 69.9, 69.8, 51.4, 40.9, 21.2; FT-IR (KBr) 3432, 3114, 3081, 2871, 2102, 1666, 1620, 1604, 1543, 1446, 1305, 1239, 1104 cm^{-1}; HRMS (ESI, positive): *m/z* calced. for $C_{44}H_{50}N_{10}O_6Ru$ $[M]^{2+}$: 458.1480, found 458.1489.



Bis(2,2'-bipyridine)[*N*-(6-aminohexyl)-4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carboxamide]ruthenium(II)bis (hexafluorophosphate) (1). To a solution of **15** (2.0 mg, 1.9 μmol) in 0.5 mL of MeOH was added 3.0 mg of 10% Pd/C (50% moisture content). After stirring under H_2 at room temperature for 7 h, Pd/C was removed by Celite filtration and the filtrate was concentrated under the reduced pressure to give **1** as a red solid. The red solid was applied next step directly without further purification.

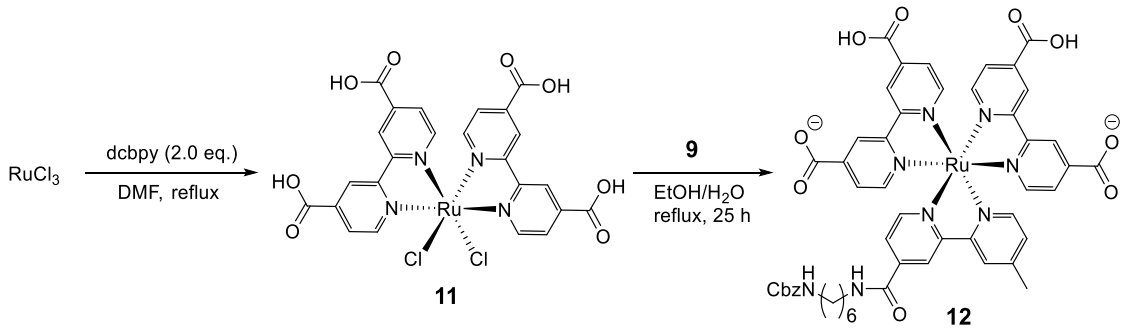


H_2N-PEG300- Ru(bpy)$_3$ (2). To a solution of **16** (10.0 mg, 8.0 μmol) in 2.0 mL of MeOH was added 3.0 mg of 10% Pd/C (50% moisture content). After stirring under H_2 at room temperature for 2 h, Pd/C was removed by Celite filtration and the filtrate was concentrated under the reduced pressure to give **2** as a red solid. The red amorphous solid was applied next step directly without further purification.



Benzyl[6-(4-methyl-2,2'-bipyridyl-4'-carboxyamido)hexyl]carbamate (9). To a solution of **5** (50.2 mg, 0.239 mmol), EDCI·HCl (59.1 mg, 0.308 mmol), HOBt (39.4 mg, 0.292 mmol) and DIEA (90.0 mg, 0.696 mmol) in 2.0 mL of DMF was added **7** (83.4 mg, 0.291 mmol) under Ar. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. After addition of EtOAc and H_2O, the organic layer was collected, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography with CH_2Cl_2:MeOH=10:1 afforded **9** as a white solid (20.8 mg, 25% yield).

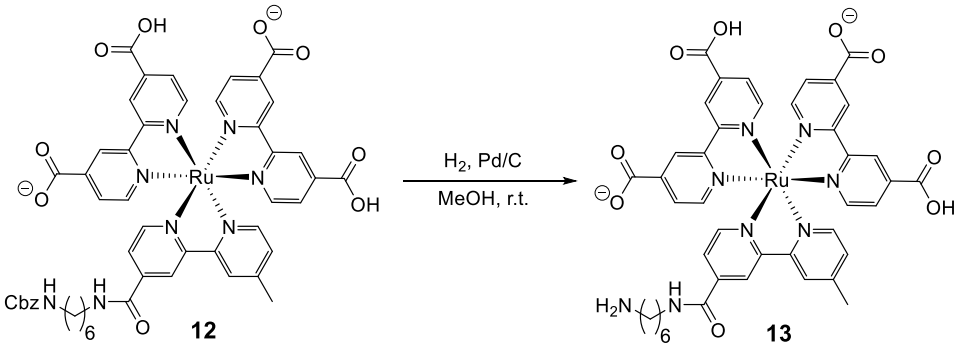
Mp 136-138 °C; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.97 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.53 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.78 (dd, J = 2.0, 5.0 Hz, 1H), 7.35-7.29 (m, 5H), 7.18 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.72 (brs, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.79 (brs, 1H), 3.46 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 3.12 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H) 1.65-1.61 (m, 2H), 1.54-1.51 (m, 2H), 1.42-1.38 (m, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN) 165.8, 157.0, 156.7, 155.3, 150.3, 149.1, 148.7, 143.0, 136.8, 128.7, 128.2, 125.4, 122.4, 122.0, 117.5, 66.8, 40.8, 40.0, 30.0, 29.8, 29.5, 26.4, 26.1, 21.4; FT-IR (neat) 3329, 3286, 3034, 2939, 2870, 1683, 1631, 1595, 1530, 1478, 1342, 1283, 1255, 1221, 1142, 1100 cm^{-1}; HRMS (ESI, positive): *m/z* calced. for $C_{26}H_{31}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 447.2391, found 447.2383.



Bis(4,4'-dicdicarboxy-2,2'-bipyridine){Benzyl[6-(4-methyl-2,2'-bipyridyl-4'-carboxyamido)hexyl] carbamate}ruthenium (II) bis-(hexafluorophosphate) (12). To a solution of $RuCl_3$ (207 mg, 1.00 mmol) in

5.0 mL of DMF was added dcbpy (487 mg, 2.00 mmol) under Ar. After stirring at 170 °C for 3 h, to the reaction mixture was added aqueous HCl solution (1 M). This mixture was cooled to 0 °C for 30 min and black precipitation was collected by filtration. The black precipitation was washed several times with 10 mL of aqueous HCl solution (1 M) three times and 5.0 mL of Et_2O three times, then dried *in vacuo* to give black solid **11**. Then, to a solution of **11** (92.1 mg, 0.139 mmol) in 8.0 mL of 75% EtOH/H_2O was added **9** (40.0 mg, 0.0925 mmol) under Ar. After stirring under reflux for 25 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified with reverse-phase column chromatography (0-20% MeCN/H_2O) to give **12** as a red solid (73.2 mg, 77% yield).

Mp >300 °C; ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.86 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 8.78 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.90 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.81 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.69-7.66 (m, 4H), 7.63 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.96-6.90 (m, 5H), 4.60 (s, 2H), 3.15 (brs, 2H), 2.78 (brs, 2H), 2.39 (s, 3H) 1.34-1.32 (m, 2H), 1.13-1.11 (m, 2H), 0.97 (brs, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) 170.6, 170.5, 170.3, 170.1, 165.3, 157.8, 157.6, 157.2, 157.1, 157.0, 155.3, 152.1, 151.9, 151.7, 151.5, 151.4, 151.0, 150.6, 145.7, 145.6, 141.9, 136.2, 128.9, 128.3, 127.9, 127.1, 126.4, 126.3, 125.3, 124.4, 123.2, 121.3, 66.0, 40.1, 28.7, 28.2, 25.7, 25.4, 20.5; FT-IR (KBr) 3329, 3286, 3067, 2938, 2870, 1683, 1629, 1608, 1541, 1370, 1267, 1137 cm^{-1}; HRMS (ESI, positive): *m/z* calced. for $C_{50}H_{42}Na_4N_8O_{11}Ru$ $[M+4Na]^{2+}$: 562.0805, found 562.0805.



Bis(4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine)[*N*-(6-aminohexyl)-4'-methyl-(2,2'-bipyridine)-4-carboxamide] ruthenium(II) bis(hexafluorophosphate) (13). To a solution of **12** (2.0 mg, 1.9 μmol) in 1.0 mL of MeOH was added 3.4 mg of 10% Pd/C (50% moisture content). After stirring for 10 h under H_2 at room temperature, Pd/C was removed by Celite filtration and the filtrate was concentrated under the reduced pressure to give **13** as a red solid. The red solid was applied next step directly without further purification.

Preparation of Ru cat.- and ligand-functionalized FG beads[2]. 0.5 mg of FG-NHS beads (Tamagawa Seiki Co. Ltd.) was washed three times with 100 μL of DMF. To the FG-NHS beads in DMF was added Ru cat. **1**, **2** or **13** (from 10 mM solution in DMF, final concentration : 0.1 mM), affinity ligand (from 10 mM solution in DMF, final concentration : 0.1 mM) and Et_3N (from 100 mM solution in DMF, final concentration : 1 mM) (final concentration of beads : 5.0 mg/mL). After stirring at room temperature for 1 h, the supernatant was removed by centrifugation (13200 rpm, 4 °C, 7 min) to give both Ru cat. and affinity ligand-functionalized FG beads. Then, to the reaction mixture was added 4-aminobutanol and stirred at room temperature for 1 h to

convert unreacted NHS ester to alcohol. The supernatant was removed by centrifugation (13200 rpm, 4 ℃, 7 min), the beads was washed with Lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 v/v% Triton X) three times and applied next step.

Electrochemical measurement.[4] Electrochemical measurements were performed with a Hokutodenkou HZ-5000 analyzer. A three electrodes system which consists of glassy carbon working electrode, a platinum wire counter electrode and an Ag/AgCl (in saturated aqueous KCl solution) reference electrode was used. The CV measurement were performed in 200 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer (pH 7.4) which contained 10% DMSO (for dissolution of substrate) and 1.0 mM substrate at room temperature. A scan rate of 100 mV/s was applied.

DLS measurement.[6] Particle size and zeta potential of Ru cat.-functionalized FG beads were measured with an electrophoretic light scattering spectrophotometer (Nano-ZS, Sysmex, Japan). Beads were suspended in H_2O and 0.5 mg/mL of beads solution was applied.

Preparation of crude cellular extract. HeLa cells (2.0×10^7 cell) was washed with phosphate buffered saline three times and added to 1 mL of EDTA. After incubation at 37 °C for 5 min, the suspension was added to 4 mL of phosphate buffered saline and HeLa cells and supernatant were removed by centrifugation (1500 rpm, r.t., 3 min). HeLa cells were washed with phosphate buffered saline three times and 1.0 mL of Lysis buffer was added. After incubation on the ice for 15 min, the sample was vortexed for 10 s, centrifuged (13200 rpm, 4 ℃, 7 min) to give supernatant as HeLa cell lysate. The concentration of HeLa cell lysate was determined by protein BCA assay.

CA purification from the protein mixture with beads.[2] HeLa cell lysate was centrifuged (13200 rpm, 4 °C, 30 min) before using to remove insoluble protein aggregates. 0.25 mg of the beads was added 100 μL of protein mixture (1 μM CA in 3.0 mg/mL HeLa lysate). After stirring at 4 °C for 4 h, supernatant was removed, the beads was washed with 100 μL of Lysis buffer three times, suspended in 40 μL of 1×SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 125 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol) and boiled at 95 °C for 5 min. The supernatant was collected by magnetic separation and analyzed by SDS-PAGE.

CA or DHFR capture from protein mixture and protein modification. To the 0.25 mg of beads was added 100 μL of protein mixture (1 μM CA in 3.0 mg/mL HeLa lysate, 1 μM CA, OVA and BSA in 10 mM MES buffer (pH 7.4) or 3.0 mg/mL HeLa lysate) and rotated at 4 °C for 4 h. Then, the supernatant was removed by magnetic separation and wash with 100 μL of Lysis buffer three times. After this washing operation, 50 μL of 10 mM MES buffer was added to the beads. To the solution of beads was added biotin-TRT (from 100 mM solution in DMSO, final concentration 500 μM) and APS (from 100 mM solution in H_2O, final concentration 1 mM). The beads was distributed and the mixture was irradiated with blue light (RELYON, Twin LED light, 455 nm) on ice for 5 min. The reaction was immediately quenched with 5×SDS-PAGE sample buffer, the

mixture was boiled at 95 °C for 5 min and the beads was removed by magnetic separation. The protein mixture was separated by SDS-PAGE with 4-20% acrylamide gradient gels (Bio Rad), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked with Immuno Block (DS Pharma), treated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (streptavidin-HRP, Sigma-Aldrich), and a blot was treated with ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

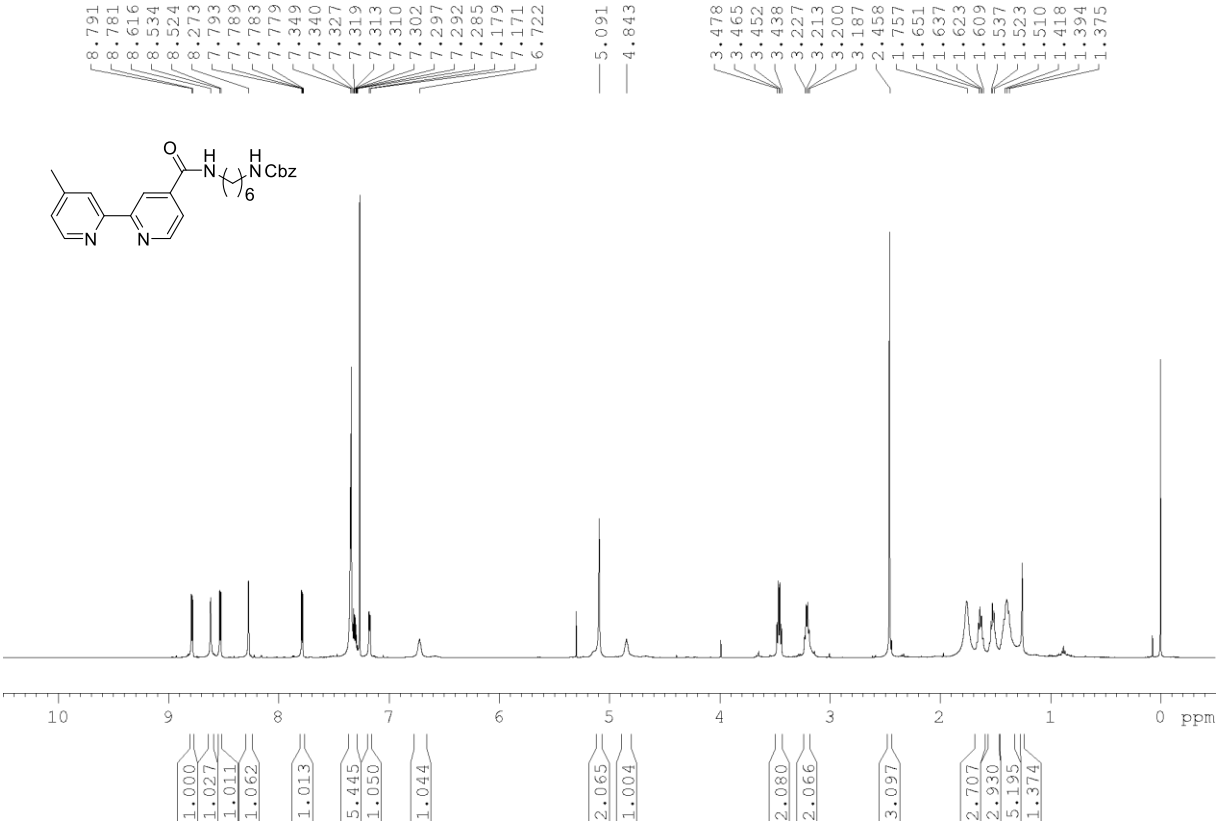
Measurement of CA activity. CA was labeled according to above-described method. After photo reaction, the reaction was immediately quenched with Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride (TCEP-HCl) (from 100 mM solution in DMSO, final concentration 1 mM), to the solution was added 60 mM acetate buffer (pH 5.2) containing 2 M NaCl (final concentration 30 mM acetate, 1 M NaCl) and incubation on ice for 10 min. The supernatant was diluted with 10 mM MES buffer (pH 7.4) and excess amount of small molecules was removed by AmiconUltra (MWCO: 10 kDa). To the labeled CA solution (50μL/well in 96 well plate) was added 4-nitrophenylacetate (1.1 mM in Tris buffer50 mM, pH 8.0, 100μL/well in 96 well plate) and the time-dependent increase inabsorbance at 340 nm (4-nitrophenol) was detected using a platereader (TECAN, Infinite F200).

CA modification in liquid phase. To a solution of 1 μM CA in 10 mM MES buffer (pH 7.4) was added biotin-TRT (from 100 mM solution in DMSO, final concentration: 500 μM), $Ru(bpy)_3Cl_2$ (from 100 mM solution in H_2O, final concentration: 1 mM) and APS (from 100 mM solution in H_2O, final concentration: 1 mM). The mixture was irradiated with blue light (RELYON, Twin LED light, 455 nm) on ice for 5 min. The reaction was immediately quenched with 5×SDS-PAGE sample buffer, the mixture was boiled at 95 °C for 5 min and analyzed according to above-described method.

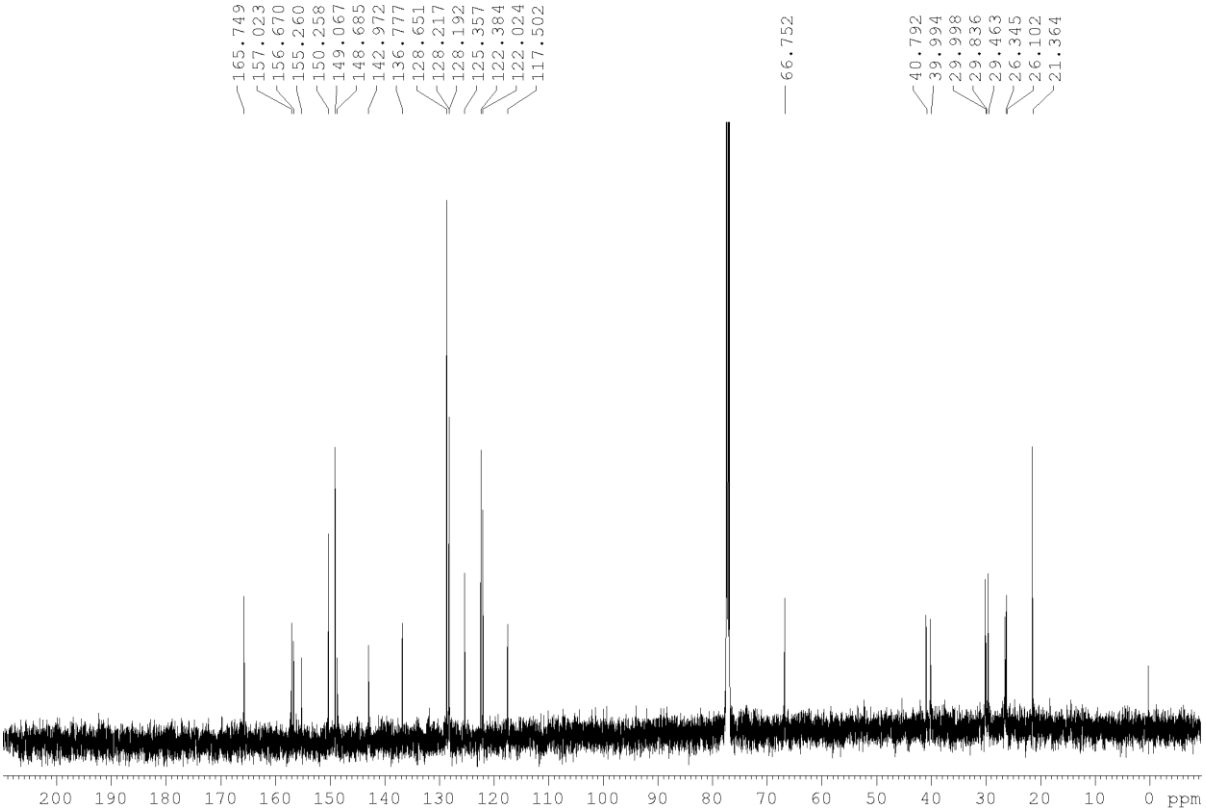
^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds

Compound 9

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

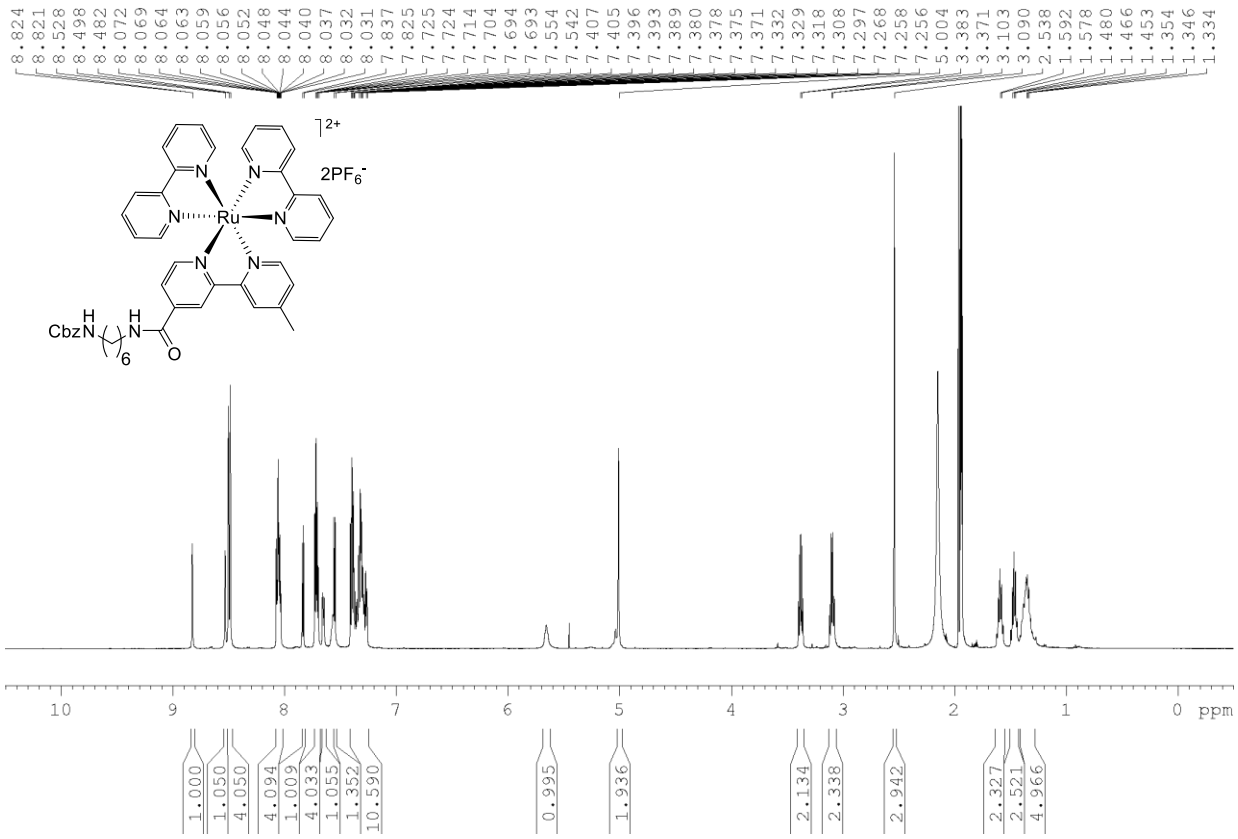


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

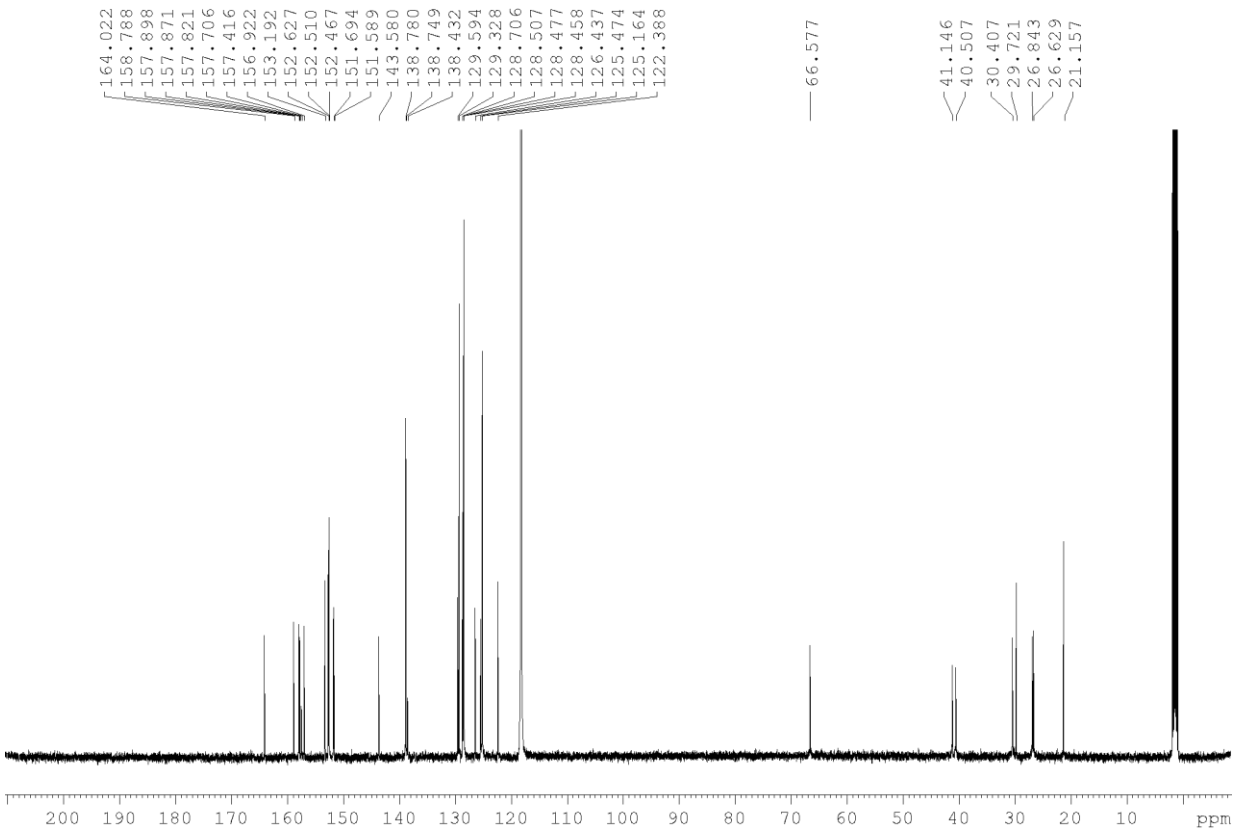


Compound 15

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3CN)

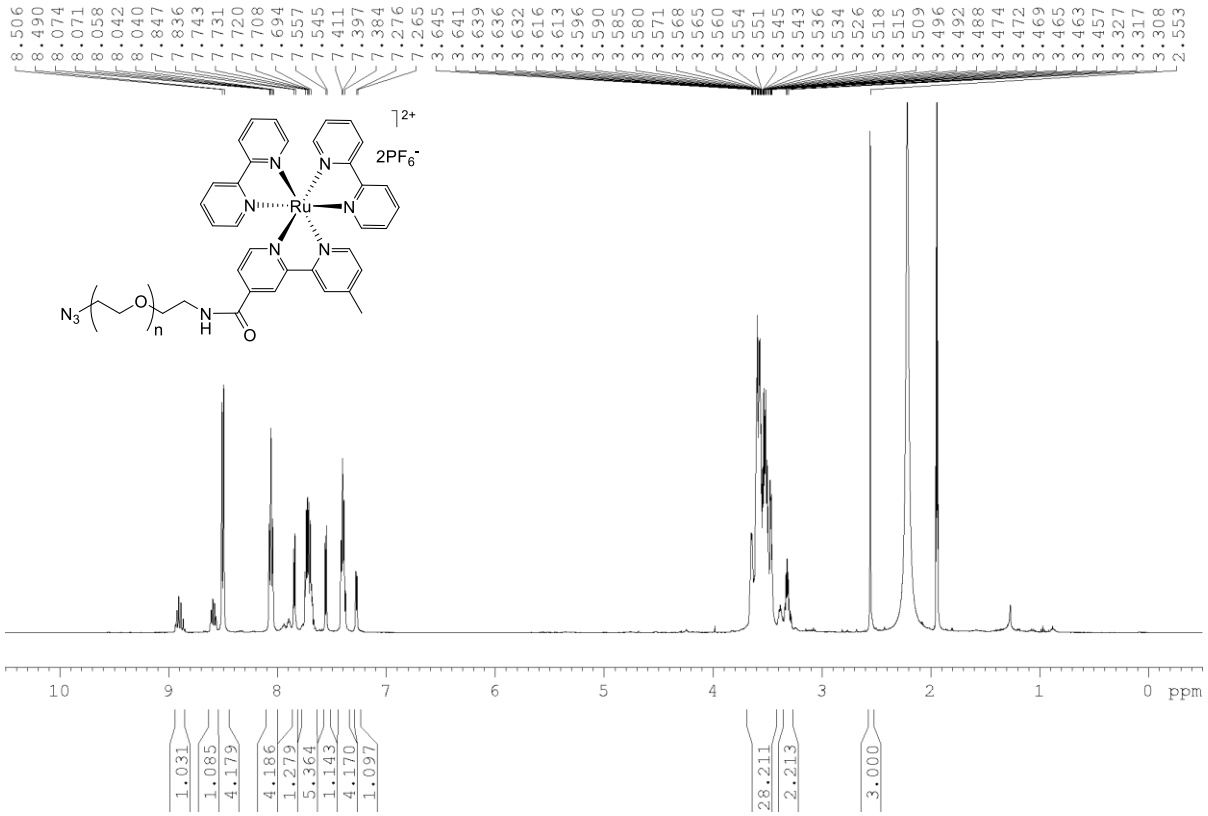


^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN)

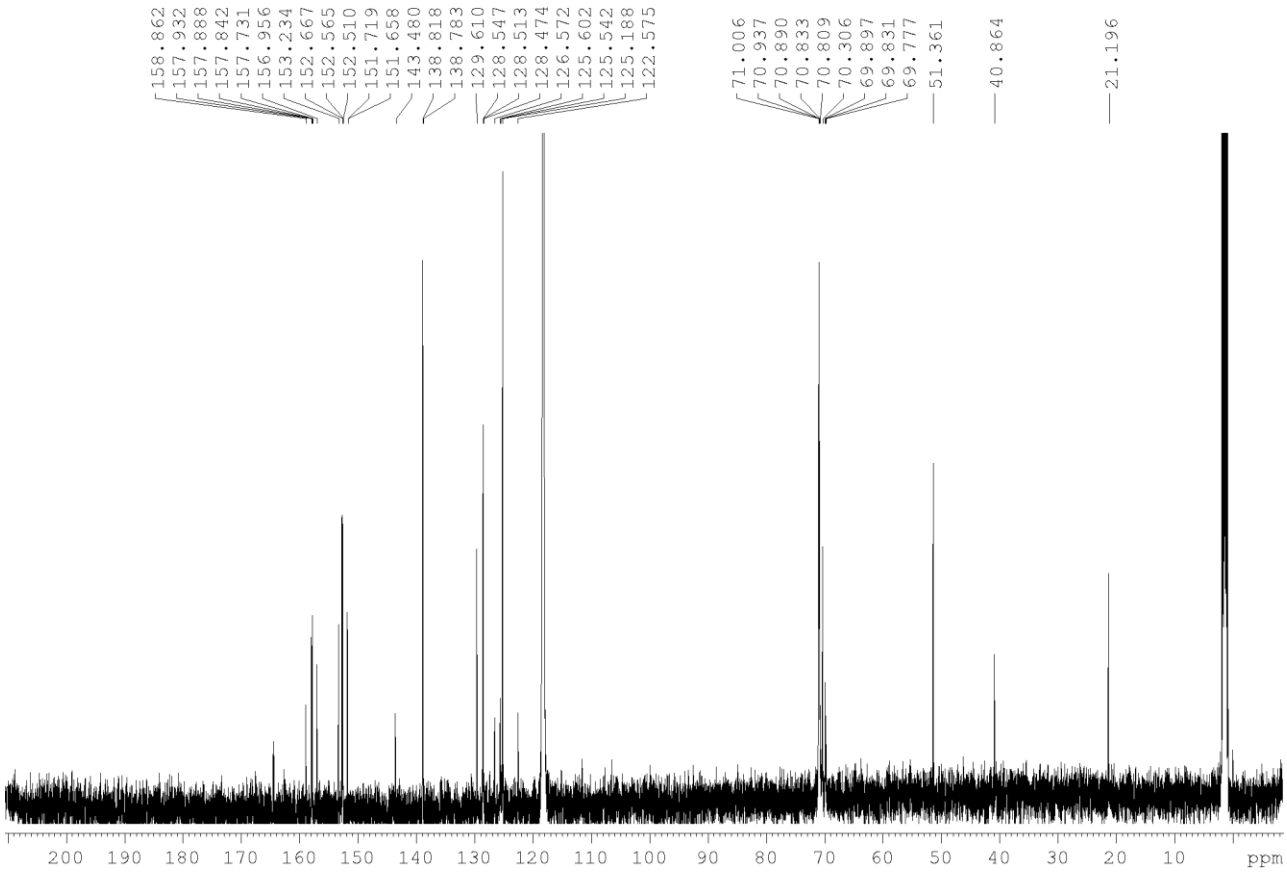


Compound 16

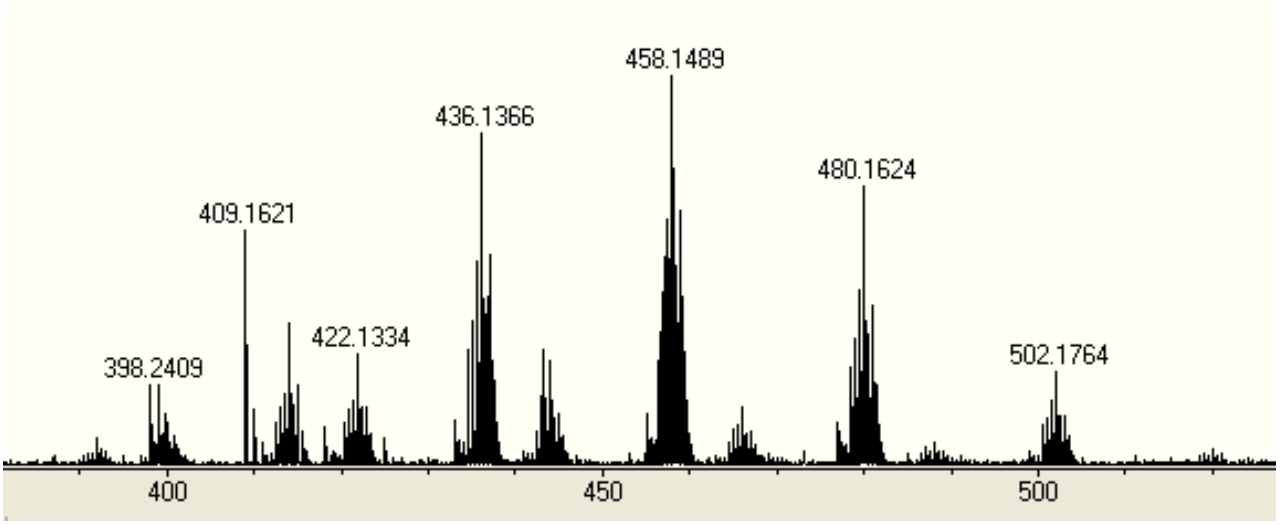
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3CN)



^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN)



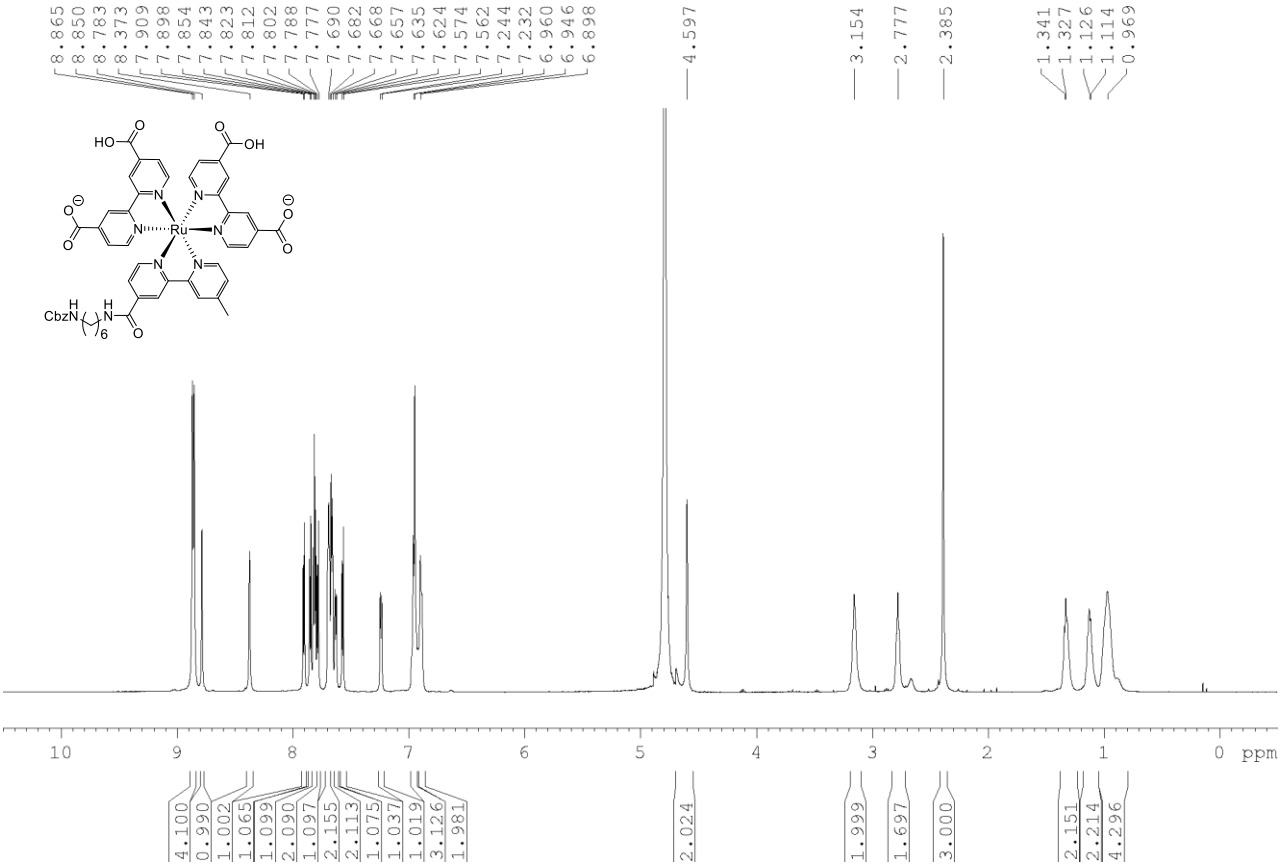
ESI-TOF MS spectrum data



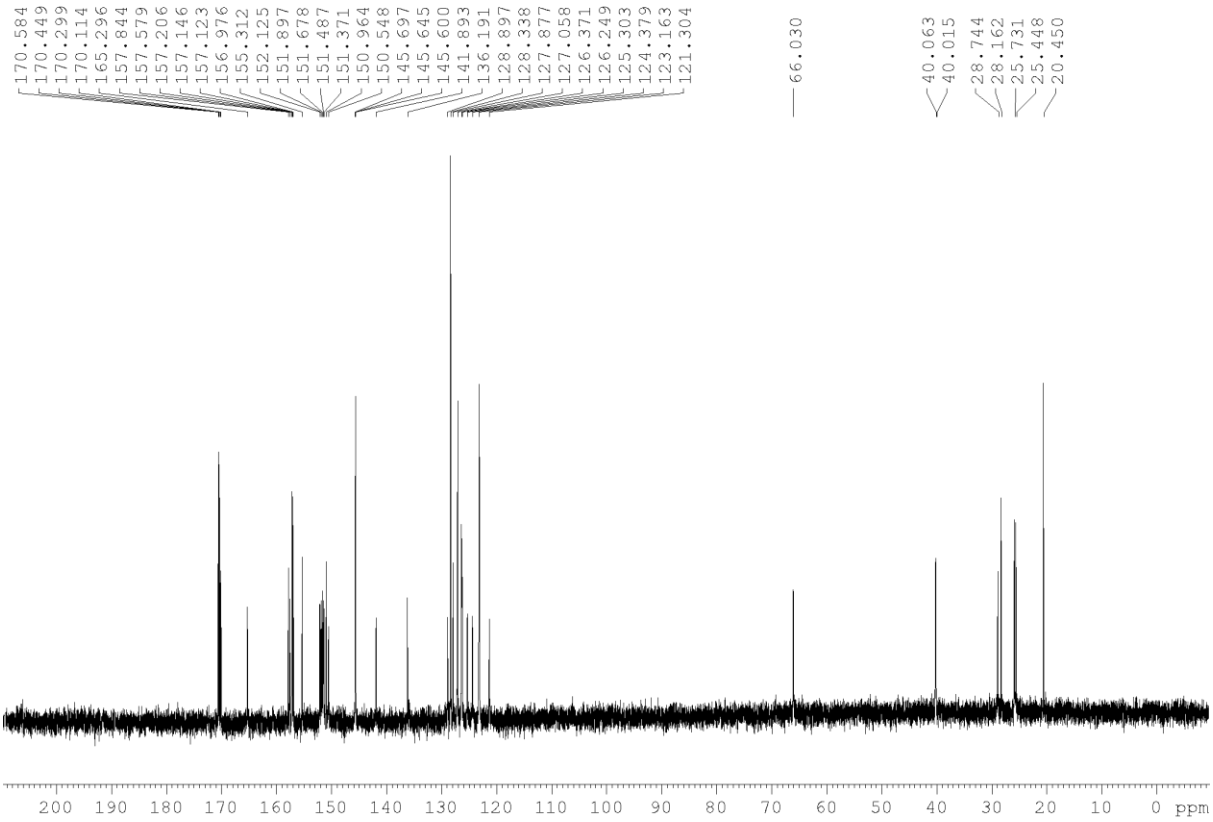
m/z

Compound 12

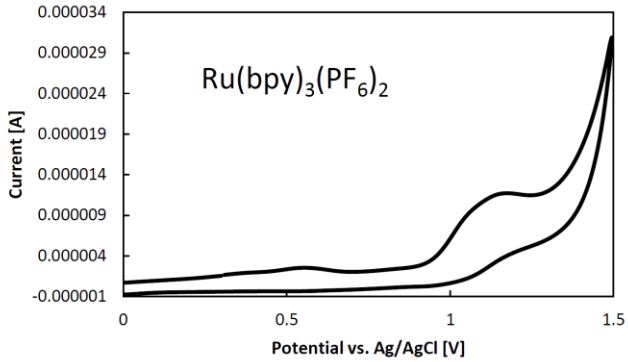
^{1}H NMR (500 MHz, D_2O)

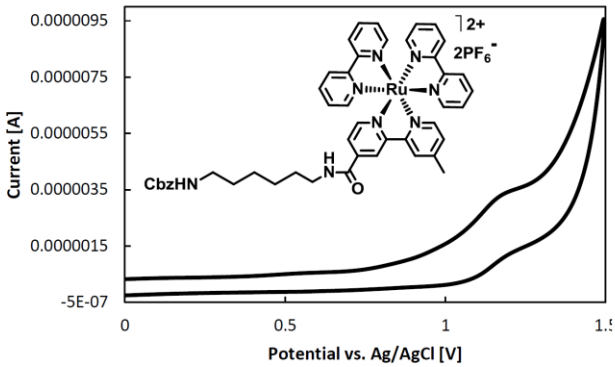


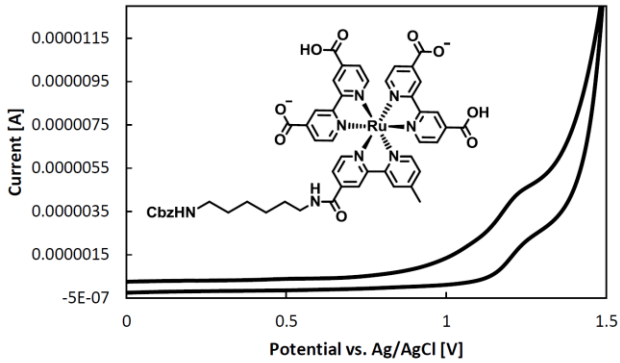
^{13}C NMR (125 MHz, D_2O)

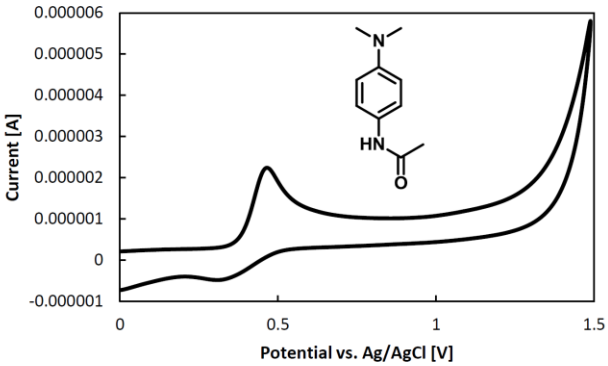


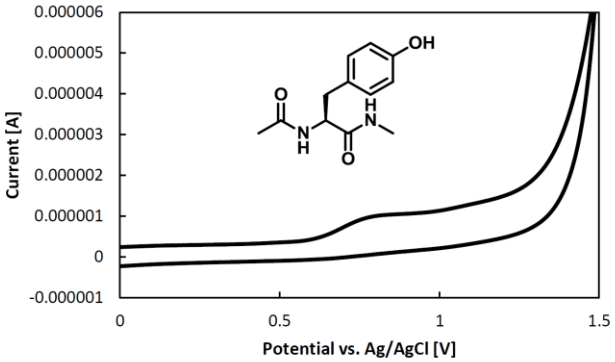
CV spectra of compounds



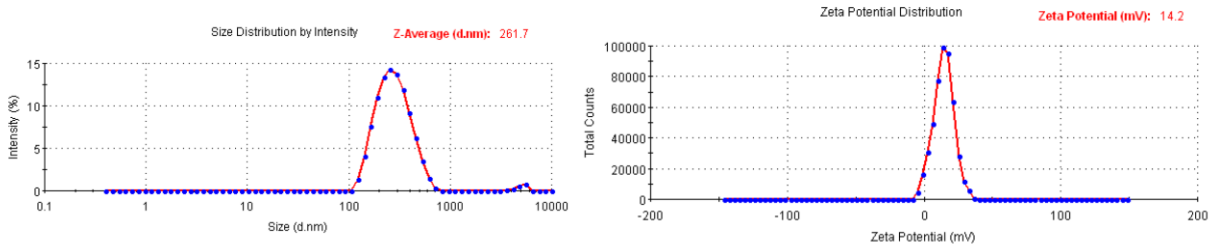




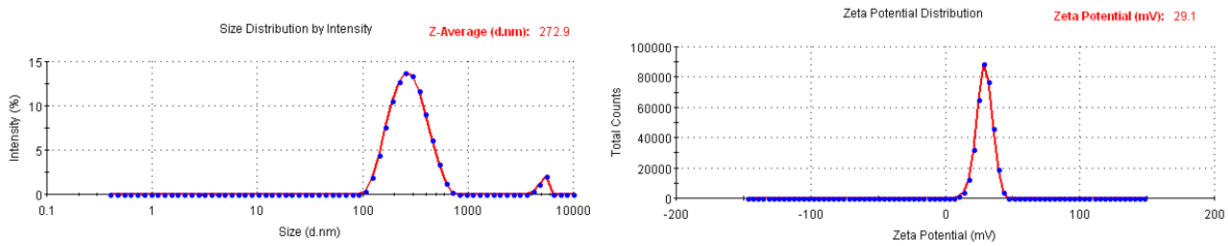




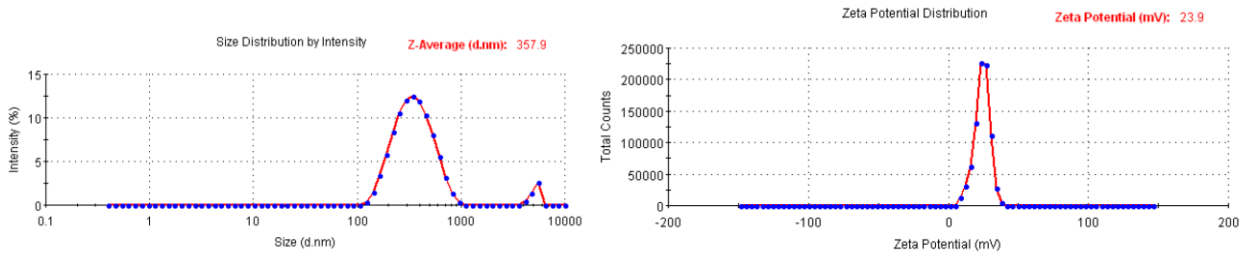
DLS spectra of beads



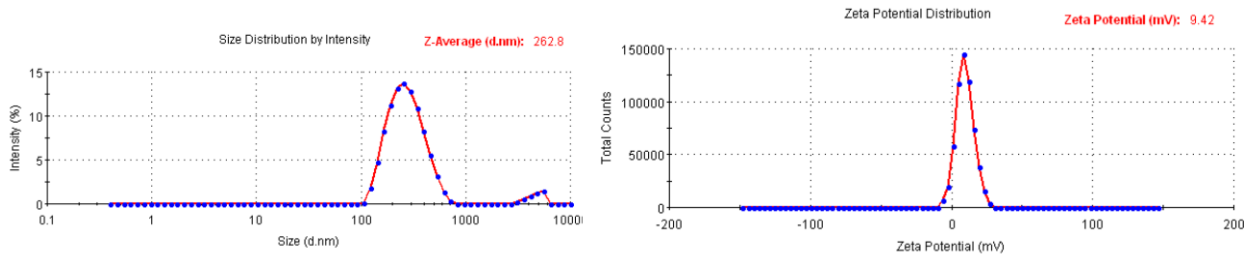
Size (left) and zeta-potential (right) of control FG beads



Size (left) and zeta-potential (right) of FG beads immobilized with **1**



Size (left) and zeta-potential (right) of FG beads immobilized with **2**



Size (left) and zeta-potential (right) of FG beads immobilized with **13**

第三章

ラジカル近接ラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) の開発

3-1. はじめに

2 章でリガンド結合タンパク質を精製しつつラベル化し、銀染色法よりも高感度にリガンド結合タンパク質を検出する手法論を開発した。しかし、精製操作を行うためリガンドとの結合力が弱いタンパク質への適用は依然として困難である。そこで Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いて、精製操作を行わず、タンパク質混在系中でもリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化ができるような手法の開発に着手した。これが実現すれば、前章に解決した検出感度に加えて、リガンド結合力の弱いタンパク質の検出が可能となる。本章では、Ru 光触媒近傍に存在するタンパク質のみをラベル化が可能なラベル化剤（近接ラベル化剤）の開発に取り組み、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質選択的なラベル化手法の実現を目指した。

3-2. TRT をラベル化剤として用いたタンパク質混在系中のリガンド結合タンパク質ラベル化

第二章では Ru 光触媒 **13** およびリガンド **16** を担持したビーズを用いて CA の精製・ラベル化を行った。本節では、タンパク質混在系中でリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することができるか検証する目的で､本ビーズを用いてタンパク質混在系中の CA のラベル化を行うこととした。BSA、オボアルブミン（OVA）および CA の 3 種類のタンパク質の混在系中に Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを加えた。このサンプルに biotin-TRT および APS を添加し光照射を行うことでタンパク質ラベル化を行った（Figure 3-1）。Ru 光触媒 **13** を担持した場合に CA および BSA に対するラベル化の進行が確認されたが、OVA にはラベル化の進行は見られなかった（lane 4）。さらに、Ru 光触媒 **13** およびリガンド **16** の両方を担持した際には CA に対する biotin-TRT の結合量が増加した（lane 5）。わずかながら BSA へのラベル化は進行しているものの、標的とする CA をより高い効率でラベル化することができた。

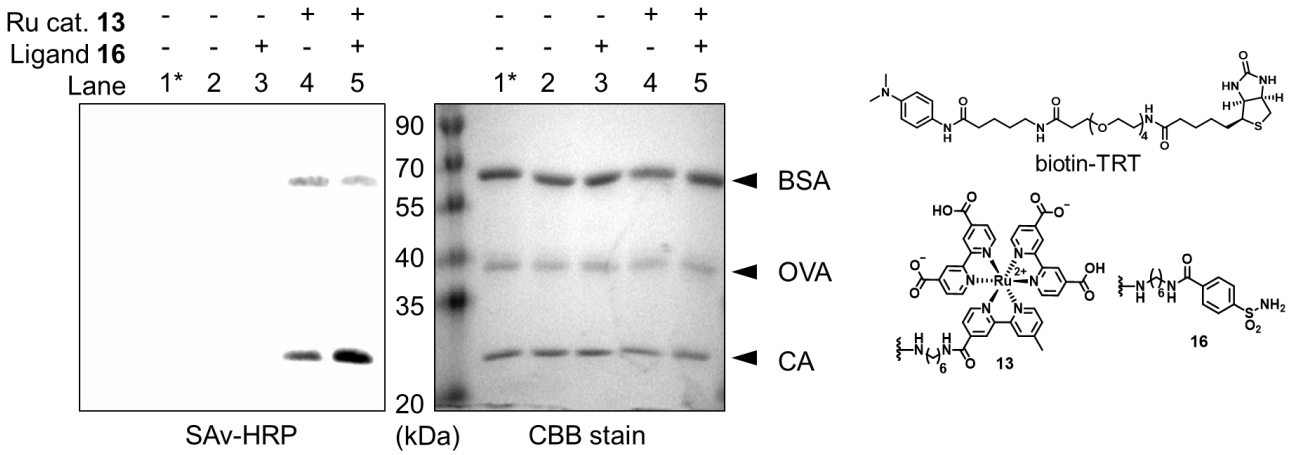


Figure 3-1. BSA、OVA、CA 混在系中でのラベル化（*Input: 1 μM BSA, 1 μM OVA, 1 μM CA）

さらに、より複雑な系でリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することができるか調べる目的で、HeLa 細胞破砕液中に CA を添加し、このタンパク質混在系中の CA を選択的にラベル化することができるか検討した（Figure 3-2）。先程と同様の条件でラベル化を試みたところ、Ru 光触媒 **13** を担持していない場合にも、タンパク質がラベル化されることがわかった（lane 2, 3）。おそらく添加している APS による酸化的な副反応によるものであると考えている。Ru 光触媒 **13** およびリガ

ンド **16** を同時に担持した場合は、CA が高い効率でラベル化を受けているものの多くの CA 以外のタンパク質もラベル化を受けており、そのバンドの出現パターンは Ru 光触媒 **13** のみを担持した場合と一致する（lane 4, 5）。本検討は十分量のリガンド結合タンパク質を添加したモデル系であるため、Ru 光触媒 **13** のみを担持したビーズとのディファレンシャル解析によって、CA のラベル化を検出することが可能になっている。しかし、より量の少ない内在性のリガンド結合タンパク質の検出を志向する場合、このリガンド非依存的なラベル化反応は決して無視できるものではない。本ラベル化システムを用いてリガンド結合タンパク質のラベル化・同定を可能にするためにはこのリガンド非依存的なラベル化反応の改善が不可欠である。

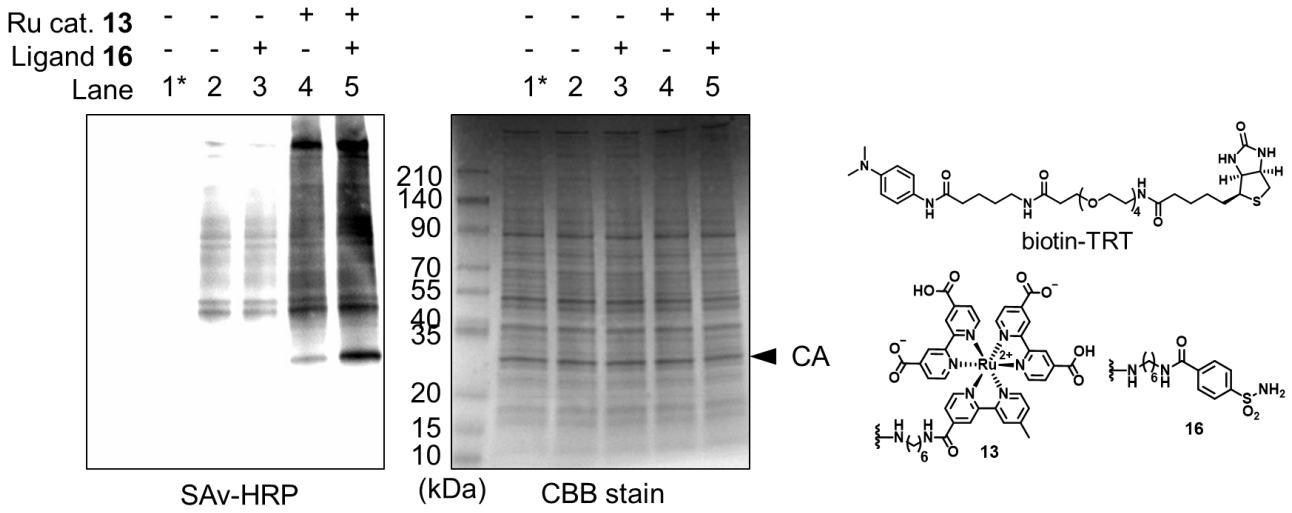
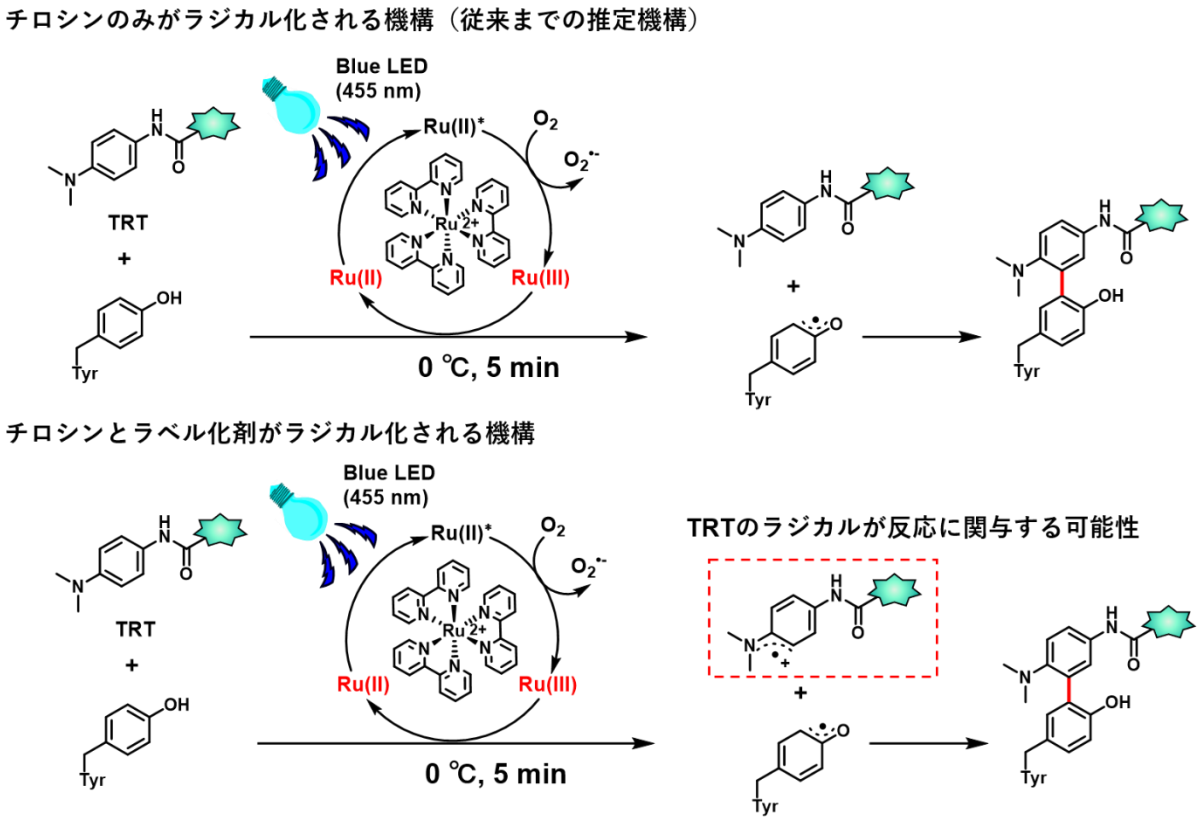


Figure 3-2. HeLa 細胞破砕液中でのラベル化（*Input: 1 μM CA in HeLa cell lysate (1.0 mg/mL proteins)）

第二章において Ru 光触媒担持アフィニティービーズに対する非特異的なタンパク質の吸着は改善している。また、ラベル化反応を促進させるために APS を添加しているものの、光反応時に見られるリガンド非依存的なラベル化（lane 4）と比較すれば、副反応によるラベル化量（lane 2, 3）は微々たるものである。生理的な条件下において一電子移動反応は半径約 1.4 nm 以内の半径で起こるという計算結果が報告されているが [1]、このタンパク質 1 つ分もしくはそれ以下の半径内に多くのリガンド非関与のタンパク質が偶発的に近づくのは困難である。これほど多くのリガンド非依存的なラベル化反応が起こるということは、実際に起こっているラベル化の半径が報告されている一電子移動反応の半径よりも広い可能性が考えられる。ラジカル的なタンパク質ラベル化法として知られる APEX 法では、ラベル化剤である biotin-phenol から生じる短寿命（< 1 ms）かつ小さな拡散半径（< 20 nm）を有するラジカルが局所的なラベル化を可能にするとされている [2]。Ru 光触媒によるラベル化においてはチロシン残基がラジカル化されるとしてきたが、ラジカル化されるフェノール部位の構造は同一であることから、チロシン残基も biotin-phenol 同様に短寿命かつ小さな拡散半径を有するはずである。このことから、このリガンド非依存的なラベル化反応の原因をラベル化剤 TRT のラジカルの寿命および拡散半径にあるのではないかと予想した。そこで、実際にラベル化剤 TRT がラジカル化を受けうるのか、またラジカル化された場合、そのラジカルの寿命や拡散半径はどのような特徴を持つのか次節以降調べることとした。



Scheme 3-1. チロシン残基ラベル化の推定反応機構

3-3. ラベル化剤の電気化学的特性およびラベル化有効距離の評価

3-3-1. TRT およびチロシンの電気化学的特性およびラベル化有効距離の評価

前節でラベル化剤である TRT がラジカル化されうる可能性について言及した。$Ru(bpy)_3$ 光触媒によってチロシンがラジカル化を受ける場合には、チロシン残基の HOMO から Ru(III)の SOMO に対する電子の授受が起こる。よって第二章でも述べたように、Ru(III)と化合物の酸化還元電位を比較することによって、化合物が Ru(III)によって酸化されうるか評価することができる。そこで $Ru(bpy)_3$ 光触媒、チロシン、TRT について酸化還元電位をサイクリックボルタンメトリー（CV）によって評価することとした。CV を用いれば、酸化還元電位のみならず、生じる中間体（ラジカル活性種）の安定性を評価することも可能である。一般的に CV を測定するとき、正方向に電位を走査した際に現れるピーク（E_{pa}）と負方向に走査した際に現れるピーク（E_{pc}）の計 2 つのピークが観測される（Figure 3-3）。しかし、中間体が不安定である場合は正方向に走査した後に中間体が構造変化し、負方向にはピークが現れなくなる。すなわち E_{pa} および E_{pc} におけるピークの強度を比較することで化合物が酸化もしくは還元されて生じる中間体の安定性を評価することができる。また、E_{pa} および E_{pc} のどちらも同程度の強度でピークが観測される系のことを「可逆な系」と呼び、可逆な系で電子移動が十分速い場合には E_{pa} と E_{pc} にはおよそ$\Delta E = 2.3RT/nF$（R: 気体定数、T: 絶対温度、n: 移動する電子数、F: ファラデー定数）程度の電位差が生じる。そのため正味の標準酸化還元電位の評価にあたっては E_{pa} と E_{pc} の平均値である $E_{1/2}$ を用いて評価するのが一般的である。

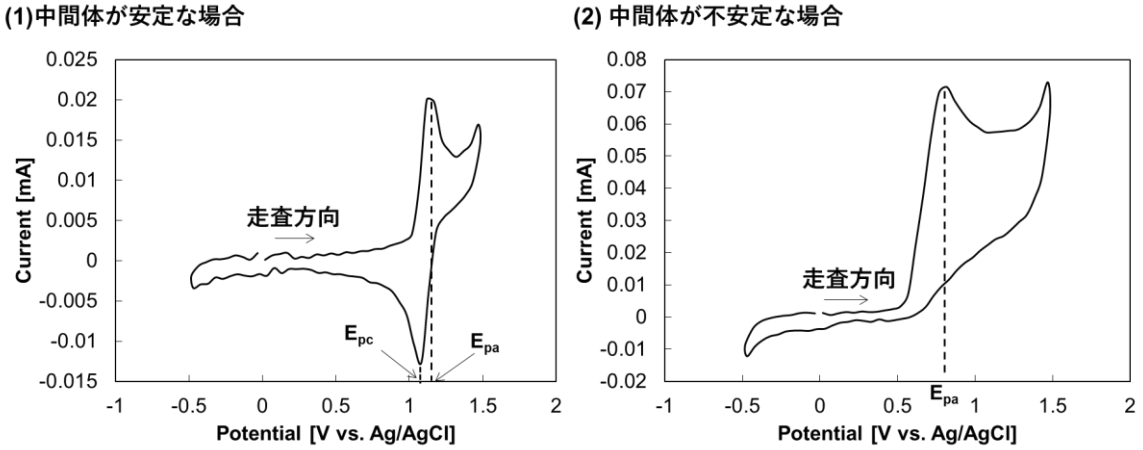
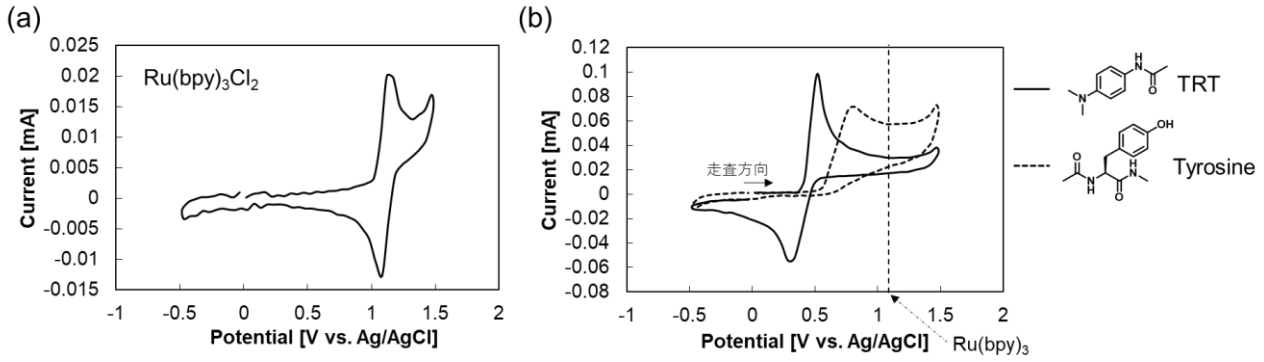


Figure 3-3. (1) 安定な中間体を生じる化合物のボルタモグラム (2) 不安定な中間体を生じる化合物のボルタモグラム

実際にラベル化反応に用いる溶媒である水溶媒系での酸化還元電位を評価するために、第二章と同様にリン酸緩衝溶液中での CV 測定を行った。$Ru(bpy)_3Cl_2$、TRT およびチロシンについて CV 測定を行ったところ Figure 3-4a, b に示すボルタモグラムが得られた。チロシンにおいては E_{pc} を評価することができなかったため、E_{pa} を用いた電位の比較を行ったところ $Ru(bpy)_3Cl_2$ では E_{pa} = 1.12 V を示した一方で、チロシンでは E_{pa} = 0.82 V、TRT では E_{pa} = 0.52 V という値を示した（Figure 3-4c）。すなわちチロシンおよび TRT の酸化還元電位はいずれも $Ru(bpy)_3Cl_2$ よりも低い値をとっておりチロシンおよび TRT のいずれも $Ru(bpy)_3Cl_2$ から生じる Ru(III)によって酸化を受けることが明らかとなった。このことから、本ラベル化反応はラベル化剤 TRT とチロシンのどちらのラジカルも関与する可能性が示唆された。



(c)

Compound	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	$E_{1/2}$ [V]
$Ru(bpy)_3Cl_2$	1.12	1.08	1.10
Tyrosine	0.82	N.D.	N.D.
TRT	0.52	0.28	0.40

Figure 3-4. (a) $Ru(bpy)_3Cl_2$ のボルタモグラム (b) TRT およびチロシンのボルタモグラム (c) 各化合物の E_{pa}、E_{pc} および $E_{1/2}$ の値。測定条件：200 mM KPi buffer (pH 7.4) containing 10% DMSO, [Substrate] = 1 mM, 走査速度: 100 mV/s, 作用極: グラス状カーボン, 対極: 白金, 参照極: Ag/AgCl

さらに、TRT およびチロシンのボルタモグラムを比較したところ、チロシンは 0.82 V を極大とするピーク（E_{pa}）が表れたのちに、逆方向への走査を行った際のピーク（E_{pc}）が表れておらず、チロシンが酸化されて生じる活性種は不安定であることがわかる。これは biotin-phenol が短寿命かつ小さな拡散半径をもつという APEX の報告と合致する。一方で TRT のボルタモグラムでは E_{pa} および E_{pc} のいずれも観測でき、可逆なボルタモグラムを示した。すなわち TRT から生じるラジカルは長寿命であり、その長い寿命に起因する大きなラベル化半径を有していることが示唆された。また本データは CV のみならず、$Ru(bpy)_3$-$(Pro)_n$-Tyr を用いたチロシン残基のラベル化検討により、当研究室の羽田野も裏付けられている [3]。ポリプロリンリンカーは 3 残基で一巻きする螺旋状の構造となり、その螺旋構造は剛直な直線状となることから「分子定規」として知られている [4]。本分子を用いることでチロシン-$Ru(bpy)_3$ 間の距離を 0.3 nm 単位で調節することが可能である。本分子を活用したラベル化有効距離の検討の結果、TRT は Ru-Tyr 間が 0.9 nm～2.4 nm のいずれの場合においてもほとんど変わらない効率でチロシン残基をラベル化することが明らかとなっている（Figure 3-5）。

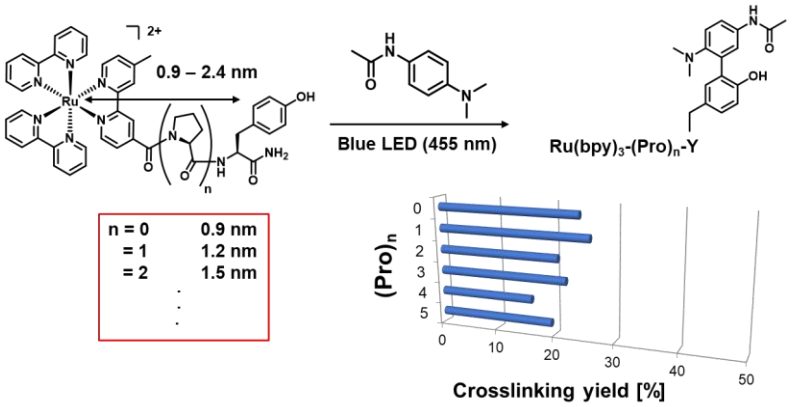


Figure 3-5. $Ru(bpy)_3$-$(Pro)_n$-Tyr を用いたチロシン残基のラベル化有効距離の検討 [3]

以上のことから、前節での仮説通り、チロシンのみならずラベル化剤 TRT もラジカル化を受けており、さらに TRT から生じるラジカルは広いラベル化有効距離を有していることがわかった。これが前節までで問題となったリガンド非依存的なラベル化反応の原因であるといえる。ラベル化有効距離の広いラベル化剤では Ru 光触媒から離れた位置に存在するタンパク質に対してもラベル化が進行しうる。短寿命のラジカルを生じるラベル化剤を用いれば、一電子移動が起こる距離である 1.4 nm 以内でラジカル種が生成し、生じたラジカル種が拡散しうる数 nm ~ 数十 nm の半径内でのみタンパク質を選択的にラベル化することが可能になる（Figure 3-6）。次節では、そのような Ru 光触媒のごく近傍でのみラジカル種を形成する近接ラベル化剤の探索を行うこととした。

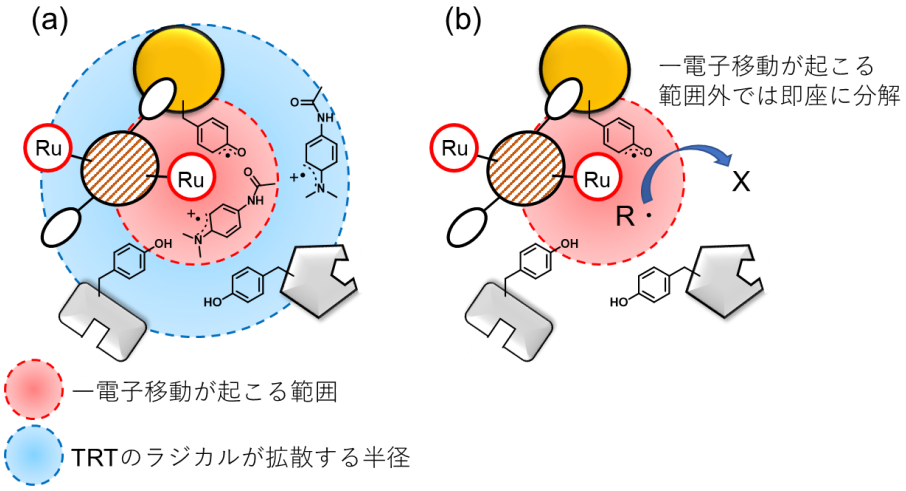
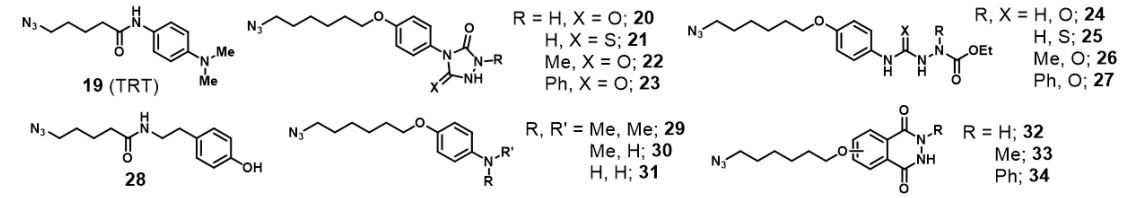


Figure 3-6. (a) 広いラベル化有効距離を有するラベル化剤（TRT）を用いたラベル化 (b) 小さなラベル化有効距離を有するラベル化剤を用いたラベル化

3-3-2. ラベル化有効距離の小さなラベル化剤の探索

前節において、従来まで用いていたラベル化剤 TRT は生じるラジカル種の安定性に起因する広いラベル化有効距離を有していることが明らかとなった。Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化するためには、Ru 光触媒のごく近傍でのみラベル化が可能である近接ラベル化剤を選定する必要がある。そこで、近接ラベル化剤の候補化合物群の CV を測定することによって、小さなラベル化有効半径をもち、リガンド結合タンパク質選択的なラベル化を可能とする化合物を選定することとした。ラベル化剤は Ru 光触媒より一電子酸化を受け、ラジカルを形成する必要があるため、酸化を受けやすい化合物がラベル化剤となりうる。そこで、ラベル化剤の候補化合物として、酸化的なタンパク質ラベル化に用いられた実例のある化合物あるいはその類縁体を評価することとした。具体的には、APEX 法で用いられる tyramide （**28**）[2]、チロシン残基のラベル化剤 PTAD の前駆体 urazole や urazole の前駆体（**20-27**）[5]、CAN によって酸化的なチロシンラベル化が可能なアニリン誘導体（**29-31**）[6]、当研究室で Hemin 触媒下チロシン残基ラベル化剤になることが見出されている luminol 類縁体（**32-34**）[7] などを評価することとした（Figure 3-7a）。まず候補化合物 **20-34** について水溶媒系における CV 測定を行った（Figure 3-7b）。また、測定の際は $Ru(bpy)_3Cl_2$ の酸化還元電位が 1.1 V（vs. Ag/AgCl）であるため、最大の電位を 1.1 V とし CV 測定を行った。

(a)



(b)

Compound	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	I_{pc}/I_{pa}
19	0.44	0.42	0.55
20	0.38	0.32	0.28
21	0.38, 0.93	N.D.	0
22	0.55	0.50	0.43
23	0.50	0.44	2.93
24	0.43, 0.79	N.D.	0
25	0.36, 0.93	N.D.	0
26	0.65	N.D.	0
27	0.71	N.D.	0
28	0.65	N.D.	0
29	0.50	N.D.	0
30	0.33	N.D.	0
31	0.36	N.D.	0
32	0.58	0.55	0.15
33	0.65	0.64	0.36
34	0.63	0.61	0.38

(c)

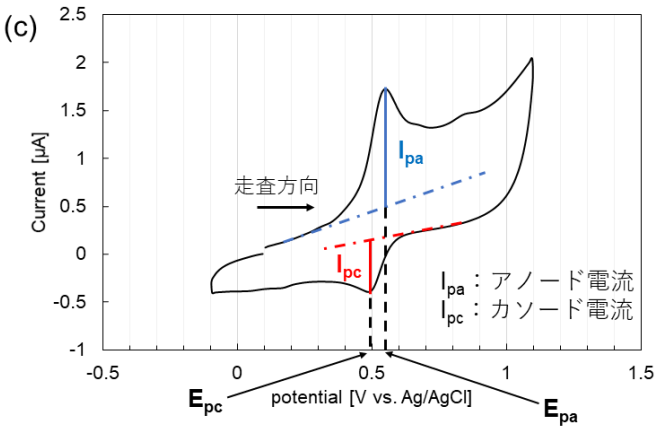


Figure 3-7. (a) 評価した候補化合物群 (b) 候補化合物の酸化還元電位および可逆性の評価 (c) 各表記の図説（測定条件：50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 0.1% DMSO, [Substrate] = 100 μM, 走査速度: 100 mV/s, 作用極: グラス状カーボン, 対極: 白金, 参照極: Ag/AgCl）

化合物 **21**, **24**, **25** については-0.1 V から 1.1 V までの走査において 2 つのピークが観測された。これは $Ru(bpy)_3$ 光触媒の Ru(III)によって二電子目の酸化が起こりうることを示している。これ以外の化合物については 1 つのピークのみが観測された。このことからいずれの候補化合物も Ru(III)による一電子的な酸化を受けることが明らかとなった。また生じる活性種の安定性を、各ピークの電流値（I_{pa} および I_{pc}）の比をとることで評価した。中間体が不安定である場合 I_{pc} の値が大きく減少するため、I_{pc}/I_{pa} の値が小さいければ小さいほど化合物から生じる活性種が不安定であることが示唆され

る。N 上にフェニル基を有する **23** は I_{pc}/I_{pa} が高い値を示しており、これは一電子的に酸化されたのちに別の化合物への構造変換が起こっており、拡散係数の違いや生じた化合物の還元様式の違いを反映している（準可逆系）。**23** 以外の候補化合物はすべて従来のラベル化剤 TRT と比較して低い I_{pc}/I_{pa} の値をとっていることから、**23** 除くすべての候補化合物は TRT **19** よりも不安定な活性種を生じることが示唆された。

3-3-3. リガンド結合タンパク質選択的なラベル化が可能なラベル化剤の選定

前節では CV を用いることで不安定な活性種を生じるラベル化剤の探索を試みたが、ほとんどの候補化合物は従来までのラベル化剤 TRT よりも不安定な活性種を生じることが明らかとなった。すなわちほとんどの候補化合物は近接ラベル化剤の候補となりうることが示唆された。そこで、前節で挙げた候補化合物を用いて実際にタンパク質混在系中のリガンド結合タンパク質をラベル化することができるか調べることとした（Figure 3-8）。3-2 節と同様に CA を添加した HeLa 細胞破砕液に対し、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを添加した。種々のラベル化剤候補化合物（**19-34**）を添加し光照射を行った。第二章では APS を添加してラベル化を行っていたが、3-2 節より、APS が酸化的な副反応を引き起こすことが示唆されたため、APS の添加を行わずに光照射を行った。ラベル化タンパク質を可視化するためにラベル化剤の有するアジド基と DBCO-Cy3 との銅フリーのクリックケミストリーによる蛍光団 Cy3 の導入を行った。SDS-PAGE によって CA のラベル化およびリガンド非依存的なラベル化量を評価したところ、**20**, **22**, **30**, **31** を用いたラベル化ではタンパク質混在系中の CA を高効率にラベル化できることが明らかとなった。**20** を用いたラベル化では CA 以外に対するリガンド非依存的なラベル化が進行したが、**22**, **30**, **31** を用いたラベル化では CA 選択なラベル化に成功した。

本検討でリガンド結合タンパク質選択的なラベル化を達成できた 3 つのラベル化剤は I_{pc}/I_{pa} の値がいずれも TRT よりも小さな値をとるものの、**22** では I_{pc}/I_{pa} = 0.43、**30**, **31** では I_{pc}/I_{pa} = 0 となっている。さらに I_{pc}/I_{pa} = 0 となっている化合物でもラベル化が進行していない化合物が多くある。また、リガンド非依存的なラベル化が進行する **20** では I_{pc}/I_{pa} = 0.28 と **22** よりも小さな値をとっているものの、ラベル化の選択性は **22** の方が高い。このことから I_{pc}/I_{pa} の値のみを用いてラベル化剤を選定することは困難であることがわかった。本ラベル化の検討においてリガンド結合タンパク質選択的なラベル化を達成できた **22**, **30**, **31** の 3 つの中で、最もラベル化効率が高い **22**（1-methyl-4-arylurazole: MAUra）を最適なラベル化剤として選定した。

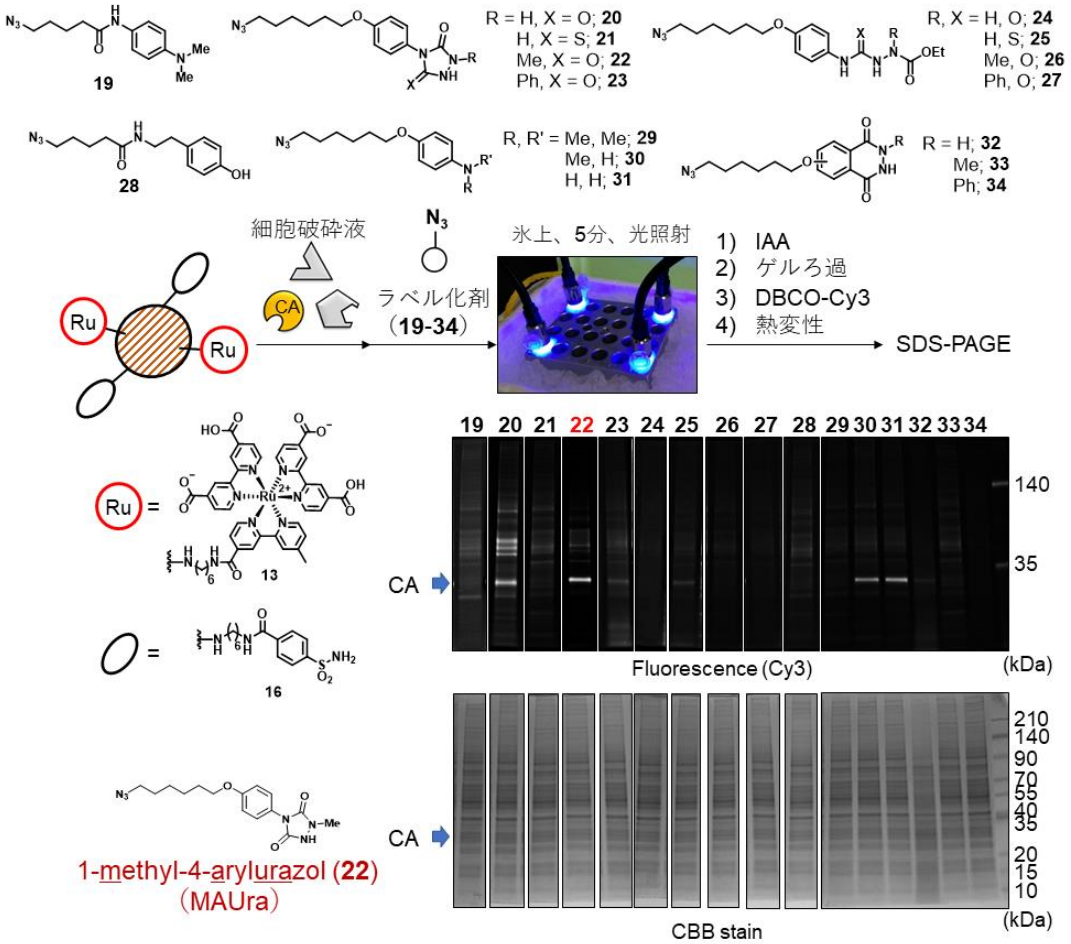
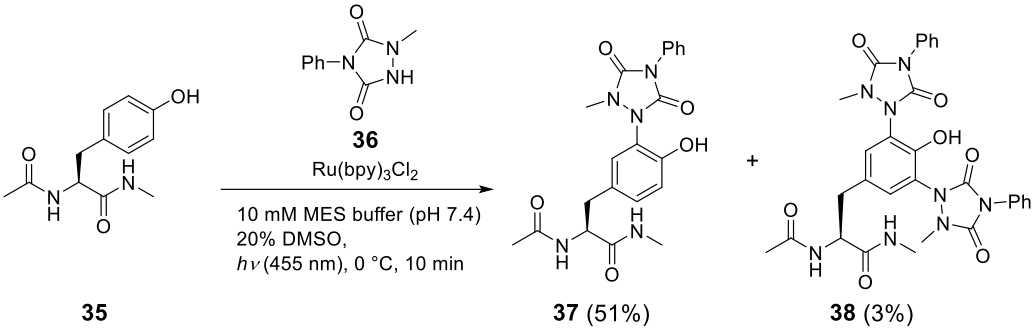


Figure 3-8. ラベル化剤スクリーニングの方法と結果

3-4. MAUra の反応様式の解明

選定されてきたラベル化剤 MAUra とチロシン残基がどのように結合しているか同定する目的で、アミノ酸のチロシン誘導体 **35** に対して $Ru(bpy)_3Cl_2$ 存在下、MAUra **36** による光反応を行い、NMR による構造決定を行うこととした。光反応を行ったところ、チロシンのもつフェノール性水酸基のオルト位で MAUra が結合した **37** が 51%の収率で生成していることが明らかとなった（Scheme 3-2）。さらに微量ではあるものの、MAUra が 2 つのオルト位に結合した **38** の生成も確認された。TRT を用いてチロシン **35** の光反応を行った際は 11%の収率で TRT が一つ結合したチロシンが得られている [8]。すなわち、TRT よりも約 5 倍高い効率で MAUra はチロシン残基と結合していることが明らかとなった。



Scheme 3-2. チロシンへの結合様式の検証

また、MAUra **36** の水溶液中における N-H プロトンは pKa = 5.2 であることが報告されている [9]。このことから、生理的 pH の水溶液中では MAUra の脱プロトン化体がラベル化反応に関わっている可能性が高い。さらに、アセトニトリル中で **36** および $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$ の CV の測定を行った。**36** では E_{pa} = 1.54 V vs. SCE、$Ru(bpy)_3(PF_6)_2$ では E_{pa} = 1.33 V vs. SCE となった（Figure 3-9）。すなわち、水溶媒中では Ru 光触媒によって MAUra を酸化できる一方で、アセトニトリル中では MAUra を Ru 光触媒によって酸化できないことを示している。水溶媒中と有機溶媒中で大きく酸化還元電位がシフトしたことからも水溶液中で MAUra は脱プロトン化体として存在することが示唆された。

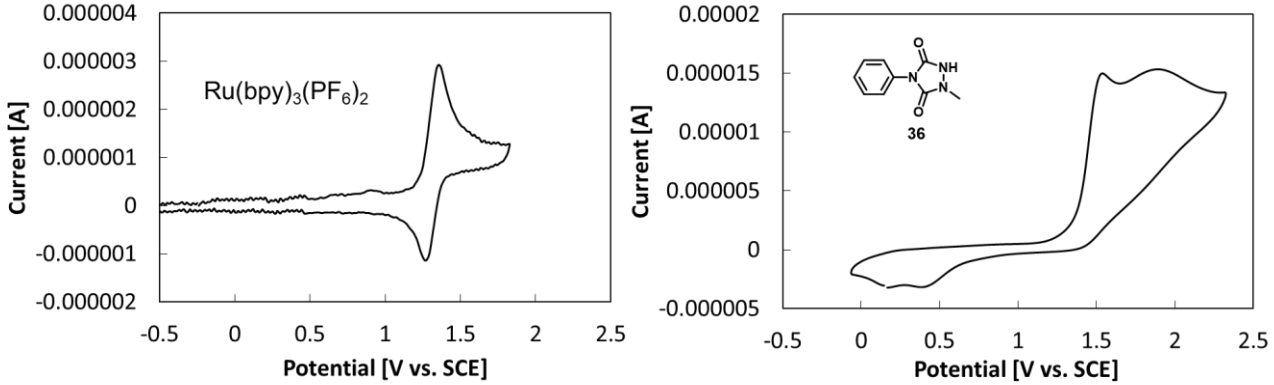


Figure 3-9. アセトニトリル中における MAUra **36** および $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$ の CV

以上の結果から MAUra を用いたチロシン残基ラベル化の推定反応機構は以下のようになると考えられる。すなわち、光照射後に生じた $Ru(bpy)_3$ 中の Ru(III)がチロシンおよび MAUra の脱プロトン

体をラジカル化する。生じた MAUra の *N* ラジカルおよびチロシルラジカルがフェノール性水酸基のオルト位でカップリングすることによってチロシン残基のラベル化が完了する（Figure 3-10）。

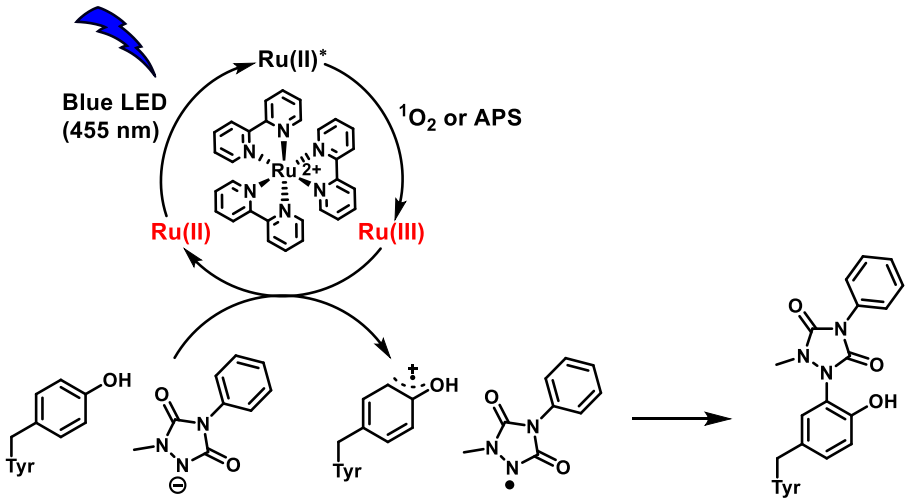


Figure 3-10. MAUra を用いたチロシン残基ラベル化の推定反応機構

さらに、3-3-1 節で述べた Ru(bpy)$_3$-(Pro)$_n$-Tyr を用いて MAUra のラベル化有効距離を評価すると、MAUra をラベル化剤として用いた際にはプロリン数が 0 個、すなわち触媒からおよそ 1 nm 以内に存在するチロシン残基が 90%の効率でラベル化される一方で、プロリン数が 1~5 の場合にそのラベル化効率が著しく低下することが明らかとなっている（Figure 3-11）[10]。

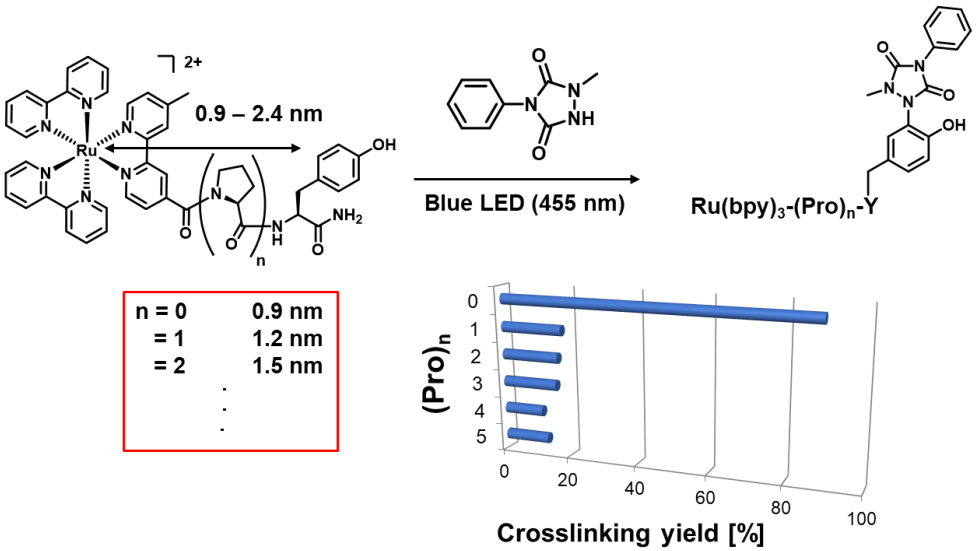


Figure 3-11. Ru(bpy)$_3$-(Pro)$_n$-Tyr を用いた MAUra のラベル化有効距離の検証 [10]

3-5. MAUra およびリガンド連結型 Ru 光触媒によるリガンド結合タンパク質選択的ラベル化反応

FG ビーズは粒径が約 200 nm であり一粒子あたりの表面積がおよそ 1.3×10^5 nm^2 である。また、表面修飾可能な官能基数は一粒子あたり 10^6 個であると言われている。ここから計算すると、リガンド-Ru 光触媒間の距離は最短でおよそ 3.5 Å である。しかし、ビーズ上に密に Ru 光触媒およびリガンドを担持しておらず、必ずしもビーズ上で Ru 光触媒とリガンドが隣り合うわけではないため、実際には Ru 光触媒とリガンド結合がどの程度離れた距離に位置しているかは定かでない。すなわち、FG ビーズ上での光反応では Ru 光触媒とリガンド結合タンパク質が近接しているのではなく、ある程度離れた距離に存在する可能性もある。そのため、MAUra のように小さなラベル化半径を有する場合には、リガンド連結型 Ru 光触媒のように触媒-タンパク質が数 nm 以内に確実に近接する系でのラベル化が最適となる可能性がある。そこで CA のリガンドと Ru 光触媒を連結した分子 **39** を用いて、HeLa 細胞破砕液中の CA を MAUra によってラベル化できるか評価することとした。また、ビーズ上でのラベル化とリガンド連結型 Ru 光触媒の場合では触媒-タンパク質間の距離が異なり、最適なラベル化剤も変わる懸念がある。したがって、CA を添加した HeLa 細胞破砕液中に Ru 光触媒 **39** を加えた後に、種々のラベル化剤（**19**, **20**, **22**, **23**, **33**）を添加し光反応を行った。次いで DBCO-Cy3 とのクリック反応後に蛍光を検出することによってラベル化効率・選択性を評価した（Figure 3-12a）。リガンド連結型 Ru 光触媒を用いた場合にも MAUra **22** が高い効率・選択性でリガンド結合タンパク質をラベル化できた。**20** および **23** は MAUra **22** には劣るものの、高い選択性で CA をラベル化することができており、**33** ではラベル化はほとんど進行していない（Figure 3-12b）。この結果から、リガンド連結型 Ru 光触媒を用いた場合も MAUra によってリガンド結合タンパク質を高い選択性・効率でラベル化できることが明らかとなった。

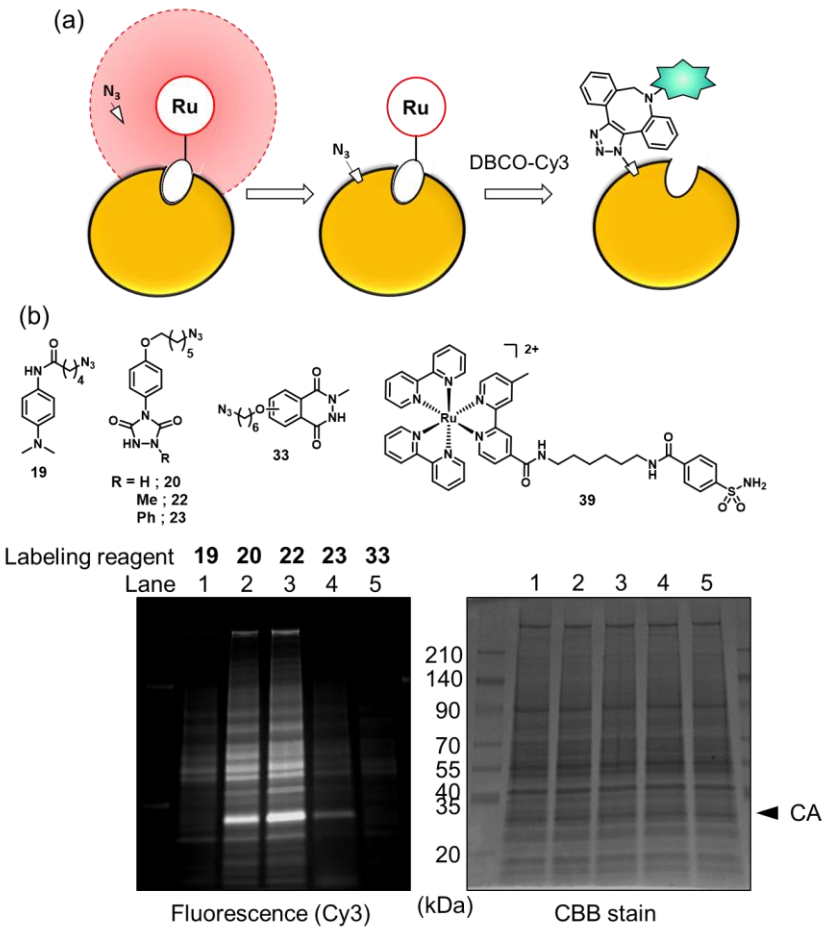
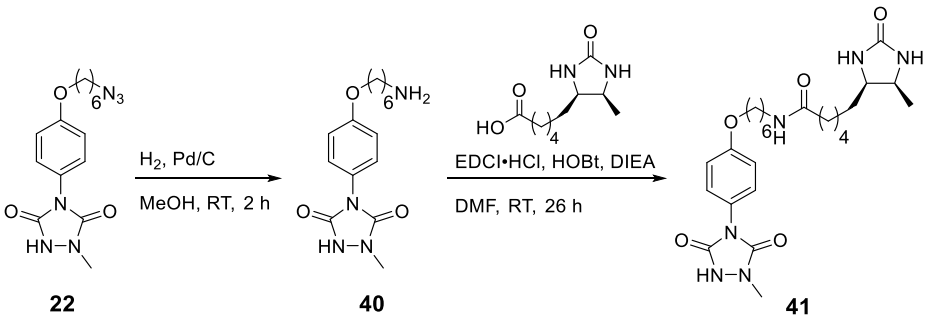


Figure 3-12. リガンド連結型 Ru 光触媒を用いたリガンド結合タンパク質のラベル化　(a) ラベル化の模式図　(b) 用いたラベル化剤・リガンド連結型光触媒とラベル化の結果

3-6. リガンド連結型 Ru 光触媒下における MAUra のラベル化効率の評価

前節まででは、合成が簡便なアジド基を導入したラベル化剤候補化合物を用いてラベル化を行った。アジド基はクリックケミストリーを用いることで種々のアルキン化合物を導入することができる利点がある。一方で、銅を用いたクリックケミストリー（Cu-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition: CuAAC）[11] では銅イオンへの配位によるタンパク質の変性を招く点、8 員環アルキンを用いるクリックケミストリー（Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition: SPAAC）[12] では銅を用いる必要がないためタンパク質の変性は避けられるものの、フリーのシステイン残基とチオール-イン反応を起こすというデメリットもある。したがって、タンパク質の変性条件を避け、SPAAC 反応の副反応などを抑えるためには直接検出基を連結したラベル化剤を用いることが望ましい。そこで、デスチオビオチンを連結した MAUra の合成を計画した。序論でも述べたようにデスチオビオチンはアビジンのリガンドであるビオチンの類縁体であり、ビオチンと比較してアビジンとのアフィニティーが 1000 倍程度低下している。これにより、アビジンビーズを用いて精製を行う際に、ラベル化タンパク質の溶出が容易になる。1000 倍のアフィニティーの低下が起こったとしても、K_d ≒10^{-12} M^{-1} と強い相互作用であるため、前章や前節で行ったようにストレプトアビジン HRP による化学発光の検出も可能である。そこで、デスチオビオチンを連結した MAUra（MAUra-DTB）の合成に着手し、MAUra-DTB によるラベル化を行ったのちにアビジンビーズによる精製を行うことでラベル化の効率を評価することとした。

MAUra-DTB の合成スキームを以下に示した。MAUra-N_3 **22** のアジド基を還元しアミン体 **40** を得たのちに、デスチオビオチンとの縮合反応を行うことによって目的の MAUra-DTB **41** を 2 工程で合成することに成功した。



Scheme 3-3. MAUra-DTB の合成スキーム

リガンド連結型 Ru 光触媒および合成した MAUra-DTB を用いてリガンド結合タンパク質のラベル化に着手した。前節までと同様に CA を標的タンパク質とし、細胞破砕液中でのラベル化を行った。MAUra-DTB を用いることで SPAAC 反応のバックグラウンドを低減し、より高いコントラストでリガンド結合タンパク質をラベル化することができた（Figure 3-13b, lane 1）。デスチオビオチンによるラベル化によりアビジンを介した精製が可能となっているため、アビジンビーズを用いて精製後、タンパク質量を評価することによってラベル化効率を評価することが可能である（Figure 3-13c）。精製したラベル化 CA のバンド強度を定量化した結果、約 19%の CA がラベル化を受けていることが明らかとなった。この値は、リガンド結合タンパク質を同定するラベル化法として汎用される光親和性標識法と比較して高効率である（光親和性標識法のラベル化効率 ＜10%）。すなわち、MAUra を用いたラベル化によって、従来法よりも高効率なリガンド結合タンパク質のラベル化に成功した。

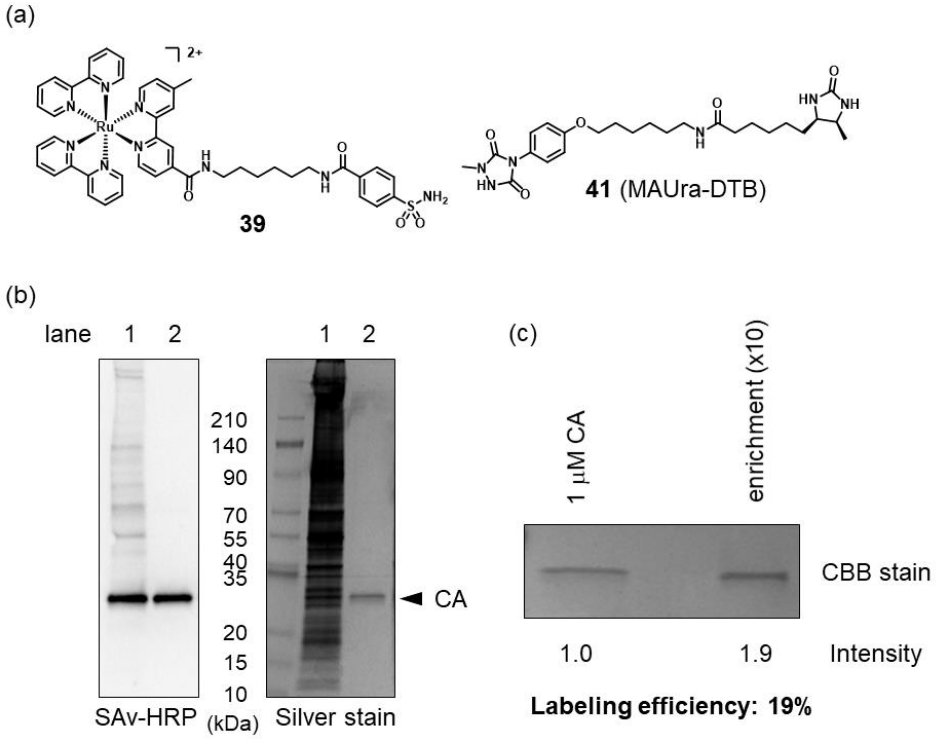


Figure 3-13. MAUra-DTB を用いたリガンド結合タンパク質のラベル化 (a) リガンド連結型光触媒およびラベル化剤の構造 (b) リガンド結合タンパク質のラベル化（lane 1: 1 μM CA in HeLa cell lysate (1.0 mg/mL proteins), lane 2: 1 μM CA） (c) ラベル化された CA の精製およびラベル化効率の評価

さらに、添加する CA の量を減らしていき、リガンド連結型 Ru 光触媒下 MAUra を用いてラベル化することで、どの程度の量までのリガンド結合タンパク質を検出可能であるか評価することとした。リガンド連結型 Ru 光触媒 **39** を添加した CA と等量添加し、MAUra-DTB によるラベル化を行った（Figure 3-14, lane 1, 3, 5）。同時に過剰量の CA リガンド **17** による競合阻害を行った条件でもラベル化を行った（lane 2, 4, 6）。競合阻害を行うことで、ビーズ上からリガンド結合タンパク質が解離するため、両者サンプルを比較することでリガンド結合タンパク質を検出することが可能である。CA を 100 nM、10 nM 添加した場合にはリガンド結合タンパク質である CA をラベル化できており、28 kDa 付近に競合阻害条件では消失するバンドが検出された。しかしながら 1 nM の条件下では競合阻害条件との比較を行っても CA のバンドを検出することができなかった。以上のことからリガンド連結型 Ru 光触媒を用いたラベル化の検出限界は数 nM~ 10 nM 程度であることが示唆された。

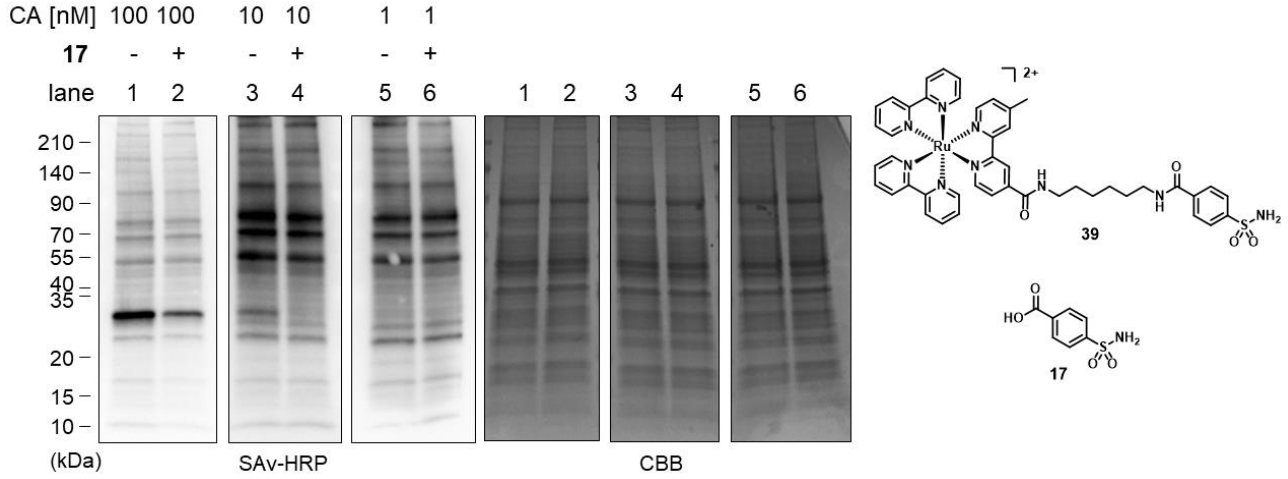


Figure 3-14. リガンド連結型 Ru 光触媒 **39** 存在下、MAUra-DTB による CA のラベル化

また上記までは CA を添加した細胞破砕液での検討であるが、内在性の CA をラベル化することも可能である。そこで、MCF-7 細胞破砕液中にリガンド連結型 Ru 光触媒 **39** および MAUra-DTB を添加しラベル化反応を行った。細胞に内在する少ない量のタンパク質であっても、リガンドを過剰量に添加したサンプルとのディファレンシャル解析を行うことによってリガンド結合タンパク質を検出することに成功した（Figure 3-15）。しかしながら、存在量の少ないリガンド結合タンパク質のラベル化では、近接ラベル化剤 MAUra を用いてもリガンド非依存的なラベル化反応が顕著に検出されることが明らかとなった。後ほど詳細を述べるが、これは Ru 光触媒に対する非特異的なタンパク質の吸着に由来するものであり、Ru/dcbpy 光触媒担持アフィニティービーズを用いることで、このリガンド非依存的なラベル化を抑制することが可能である。

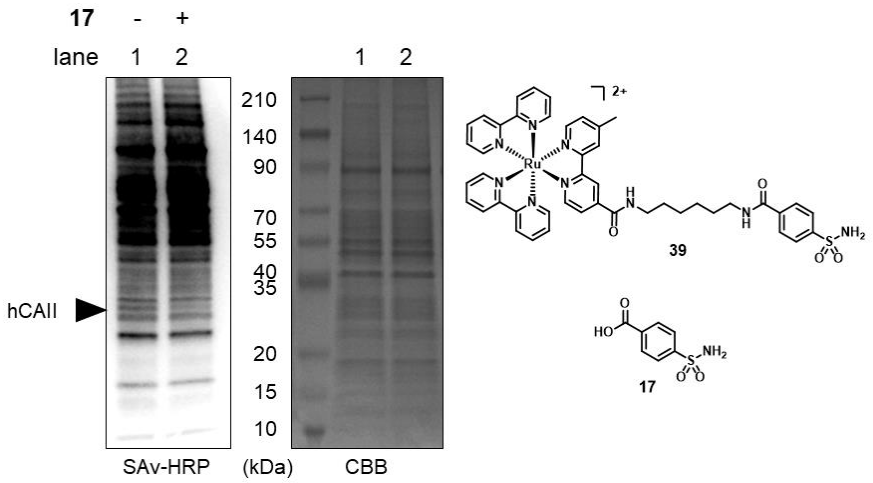


Figure 3-15. MCF-7 細胞に内在する hCAII のラベル化検討

3-7. アフィニティービーズのスクリーニング

第二章や前節まででは、アフィニティービーズとして FG ビーズを用いてリガンド結合タンパク質選択的なタンパク質ラベル化を行ってきた。しかし、FG ビーズを用いた際には微量にコンタミネーションしたケラチンがビーズに吸着しラベル化を受け、検出の妨げになることを第 2 章（2-6-1 節）で述べた。もしコンタミネーションしたケラチンの吸着が改善できれば、タンパク質混在系中でラベル化反応を行う本系でも非特異的なラベル化を抑制できる。さらに、以降の目的はリガンド結合タンパク質の精製ではなく、Ru 光触媒 **13** 担持ビーズを用いたタンパク質混在系中でのリガンド結合タンパク質のラベル化である。すなわち、精製用途とは最適なビーズが異なる懸念もある。そこで本節ではアフィニティービーズのスクリーニングを行い、さらなる選択性の向上・以降の検討に最適なビーズの選定を行うこととした。磁気ビーズにはタンパク質を担持し小分子や相互作用相手であるタンパク質を精製するもの、His タグなどでタグ化されたタンパク質を精製するためニッケルで表面修飾されたもの、核酸を担持し mRNA や DNA を精製する用途のものや小分子リガンドや抗体を担持し天然のリガンド結合タンパク質や抗原を精製する用途のものなど様々である。これらの中でも天然のタンパク質を精製する用途の磁気ビーズで代表的なものを Table 3-1 に示した。

Table 3-1. 市販される代表的な磁性アフィニティービーズの特徴

<table>
<tr><th colspan="2">製品名</th><th>粒径 [μm]</th><th>材料</th><th>ビーズ表面の官能基</th></tr>
<tr><td colspan="2">FG beads</td><td>0.2</td><td>フェライト粒子を内包したポリスチレンを親水性のポリグリシジルメタクリレートでコーティング</td><td>エポキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、カルボキシル基、トシル基、NHS エステル</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Dyna beads</td><td>MyOne</td><td>1</td><td rowspan="4">フェライト粒子を親水性ポリマーでコーティング</td><td>トシル基
カルボキシル基</td></tr>
<tr><td>M-270</td><td>2.8</td><td>エポキシ基、アミノ基、カルボキシル基、トシル基</td></tr>
<tr><td>M-280</td><td>2.8</td><td>トシル基</td></tr>
<tr><td>M-450</td><td>4.5</td><td>トシル基
エポキシ基</td></tr>
<tr><td colspan="2">PureProteome Magnetic beads</td><td>10</td><td>磁性粒子を多孔性シリカでコーティング</td><td>カルボキシル基
NHS エステル</td></tr>
</table>

FG ビーズや Dyna ビーズは表面が親水性のポリマーで覆われているため、疎水性表面の場合と比較してタンパク質の非特異的な吸着は起きにくい。一方で、PureProteome Magnetic beads は多孔性シリカで覆われている。疎水性表面処理が施されているかは定かでないが、多孔性の表面構造に設計することによって表面積が広くなっており、より多くのリガンドを担持することができる。担持量が多くなればより多くのリガンド結合タンパク質がリガンドに結合するため、リガンド結合タンパク質のラベル化選択性向上が期待できる。また、Dyna ビーズは様々な粒径のビーズが存在するが、

光反応を行うことまで考慮すると、粒径が小さいビーズであればあるほど分散性が高く光を遮蔽しにくいためアフィニティービーズ上でのタンパク質ラベル化には粒径の小さな MyOne が適していると考えた。そこで本節では、FG ビーズ（①）の他に Dyna beads MyOne（②）や PureProteome Magnetic ビーズ（③）の 3 種類の磁気ビーズを用い、本手法に最適な固相担体を模索することとした。

3-7-1. 各アフィニティービーズのリガンド結合タンパク質精製能の評価

まず、前述した 3 種類のアフィニティービーズのリガンド結合タンパク質の回収量や非特異的なタンパク質の吸着性を評価する目的で、Ru 光触媒 **13** やリガンド **16** を担持したビーズを用いてリガンド結合タンパク質の精製能を評価することとした。Dyna ビーズは NHS エステルで表面修飾されたビーズが市販されていないため、Dyna ビーズ表面のカルボン酸を EDCI による活性化後 NHS と縮合することによって、NHS エステルで表面修飾された Dyna ビーズを得た。NHS エステルで表面修飾されたビーズに対して、今までどおりの手法で Ru 光触媒 **13** およびリガンド **16** を担持した。CA を添加した HeLa 細胞破砕液中から各種ビーズを用いて CA の精製を行った（Figure 3-16）。PureProteome Magnetic ビーズ（③）では、リガンド **16** や Ru 光触媒 **13** を担持していない場合でも多くの非特異的吸着が観測された（lane 8 - 10）。これは PureProteome Magnetic ビーズの多孔性の表面構造にタンパク質が物理吸着を起こしたためであると考えている。FG ビーズを用いた際には、非特異的なタンパク質の吸着を抑えつつ、CA を精製することができているものの、分子量 50 kDa 以上の領域にわずかながらタンパク質の非特異的な吸着が生じていた（lane 2-4）。Dyna ビーズ（②）を用いた場合では、非特異的なタンパク質の吸着も確認されるものの、FG ビーズ（①）と比較しておよそ 4 倍量のリガンド結合タンパク質を精製できることが明らかとなった（lane 2 - 7）。すなわち FG ビーズよりも Dyna ビーズの方がリガンド結合タンパク質を多く捕捉することができる。FG ビーズでは、ビーズ表面の NHS エステルが約 200 nmol/mg であるのに対して、Dyna ビーズではビーズ表面のカルボン酸は 400-800 nmol/mg である。すなわち Dyna ビーズの方がビーズ表面に担持できるリガンドが最大で 4 倍増えるため、CA の回収量が 4 倍になったという結果に一致する。また、ビーズの粒径は FG ビーズが 0.2 μm に対して Dyna ビーズは 1 μm である。ここから体積を計算すると Dyna ビーズは FG ビーズの約 120 倍の体積である。ビーズの比重が同じだと仮定すれば、同じ質量のビーズを用いたとき用いた粒子数は 1/120 となる。すなわち Dyna ビーズでは 1 粒子あたり $4 \times 120 = 480$ 倍の官能基数となっている。表面積は Dyna ビーズが FG ビーズに比べて 24 倍であるため単位面積当たりでは 20 倍官能基数が多いことになり、Dyna ビーズ表面の官能基間の距離は FG ビーズのおよそ 1/4 となる。これは FG ビーズよりも Ru 光触媒およびリガンドがより接近した位置に配置されていることを意味する。すなわち Dyna ビーズ表面上では Ru 光触媒とリガンド結合タンパク質が FG ビーズ上よりも近接した状態で光反応を行えることが期待できる。

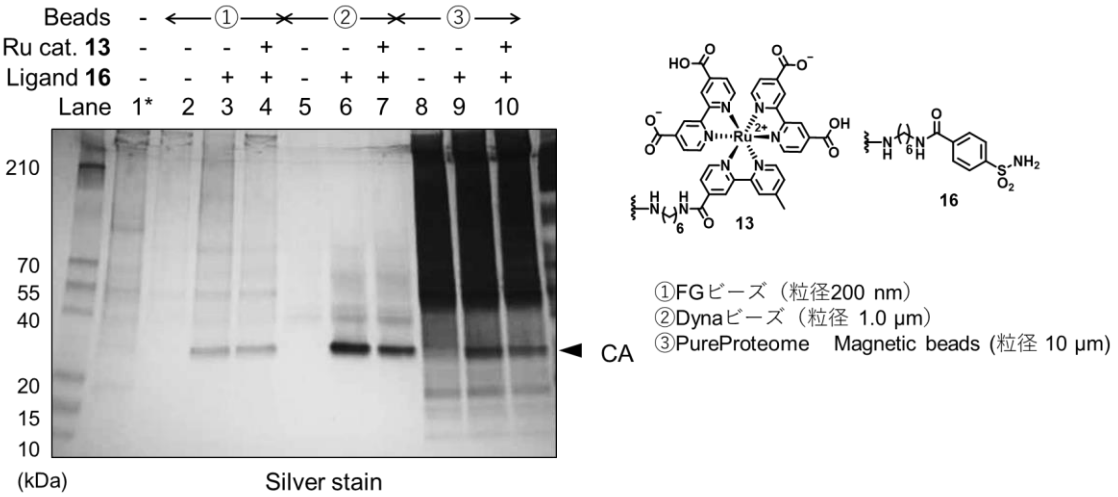


Figure 3-16. 各種アフィニティービーズを用いた CA の精製 (*Input: 1/10 dilution of 1 μM CA in 3.0 mg/mL HeLa cell lysate)

2-6 節と同様に、ビーズへの非特異的な吸着と表面電位の相関を調べる目的で Dyna ビーズの DLS の測定を行った（Table 3-2）。2-6 節で測定した FG ビーズのゼータ電位とは異なり、Dyna ビーズのゼータ電位は NHS エステルのキャッピングのみを行った Control および Ru 光触媒 **13** を担持したビーズのいずれにおいても負の値を示した。FG ビーズではビーズ表面は正電荷から中性に近づく程、タンパク質の非特異的な吸着が抑制されることを明らかにした。これは、正電荷が中和されることによって、タンパク質表面のアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基と相互作用が起こるためであると考察している。同様に考えれば、負電荷にビーズ表面が帯電してしまえば、リジン残基やアルギニン残基との相互作用が起こるはずであるが、予想に反して非特異的な吸着は起こっていない（Figure 3-16, lane 5）。詳細な理由はわからないが、これは固体表面が-30 mV 程度までの負電荷であればタンパク質の非特異的な吸着を引き起こさないことを示す結果である。また、Dyna ビーズは粒径 1 μm であるが、DLS で測定した粒径はいずれも 1 μm よりも大きい数値であった。これは溶液中では溶媒によってポリマーが膨潤しており、粒子径が大きくなったのだと考察している。さらに Ru 光触媒 **13** を担持した Dyna ビーズは Control と比較して粒径が小さくなっている。これは Ru 光触媒 **13** の担持によってビーズ表面の負電荷がわずかに中和され、ポリマー分子の静電気的な反発が抑制されたためであると考察している。

Table 3-2. Ru 光触媒担持 FG ビーズおよび Dyna ビーズの DLS 測定結果

ビーズ		粒径 [nm]	ゼータ電位 [mV]
FG ビーズ	Control	261.7	+14.2
	Ru 光触媒 **13** 担持	262.8	+9.42
Dyna ビーズ	Control	1563	-31.3
	Ru 光触媒 **13** 担持	1343	-26.5

3-7-2. 各アフィニティービーズを用いたリガンド結合タンパク質の精製・ラベル化

前節より、精製能は Dyna ビーズが最も優れていることが明らかとなった。しかし、FG ビーズは粒径がおよそ 200 nm であるのに対して、Dyna ビーズは 1.0 μm と粒径が大きくなっている。この粒径の違いは光反応の効率に大きく関わってくると考えている。すなわち、光を遮りやすくなり、ビーズの沈殿も起こりやすくなるためビーズに対して均等に光照射をすることがより困難になる。これによって Dyna ビーズでは光反応効率が FG ビーズよりも低下することが懸念される。そこで第二章と同様の手法で各種アフィニティービーズを用いた CA の精製・biotin-TRT によるラベル化を行い、そのラベル化効率を評価した（Figure 3-17）。タンパク質精製量は FG ビーズよりも Dyna ビーズがおよそ 4 倍優れているのに対し、光反応効率は FG ビーズよりも Dyna ビーズがおよそ 2 倍向上するにとどまった（lane 4, 7）。このことから、光反応効率は懸念していた通り粒径の増大に伴い減少している。しかしながら、FG ビーズでは非特異的なラベル化によるシグナルも観測されているが、Dyna ビーズではこれがほとんど観測されていない。すなわち標的選択性の向上に成功しているため、FG ビーズの際とは異なり、より高分子量のタンパク質をラベル化・検出する場合もシグナルがバックグラウンドに埋もれる懸念が少なくなる。このことからラベル化を行う場合にもアフィニティービーズは Dyna ビーズが最適であることが示唆された。

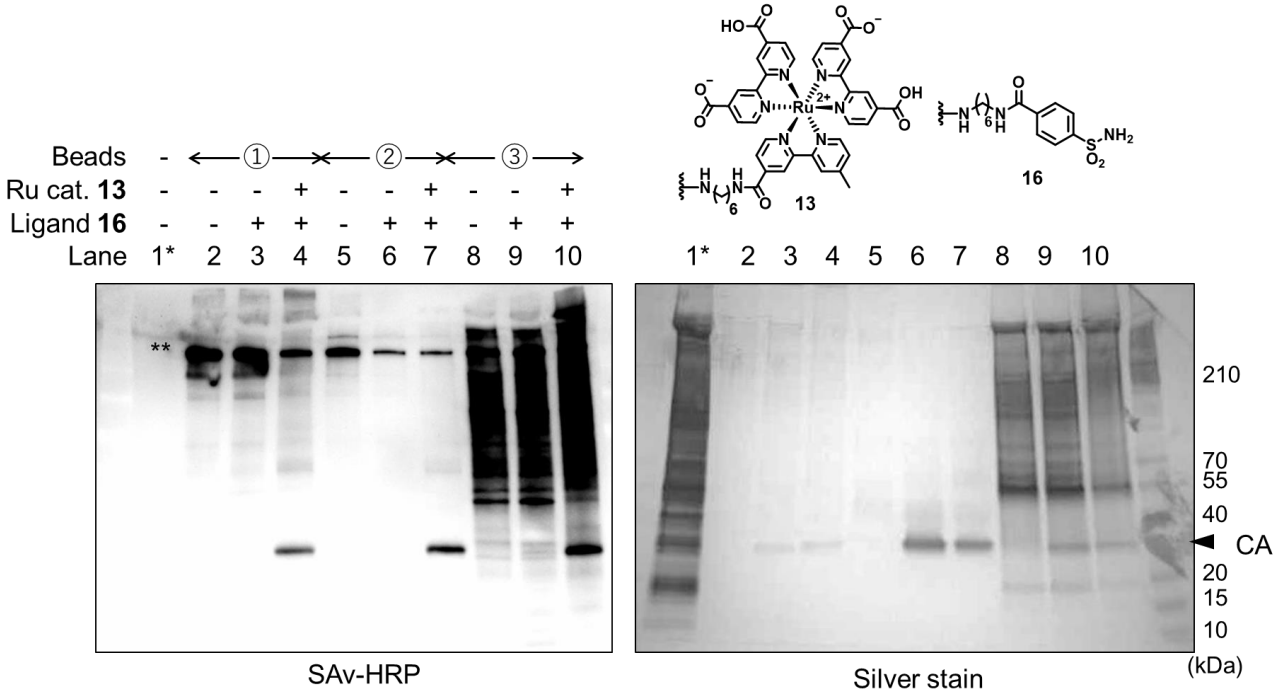


Figure 3-17. 各種ビーズを用いた CA の精製・ラベル化 (* Input: 1 μM CA in 3.0 mg/mL HeLa cell lysate、**凝集した不溶性のタンパク質)

3-7-3. Ru 光触媒担持 FG ビーズおよび Dyna ビーズを用いたリガンド結合タンパク質ラベル化

前節では Dyna ビーズを用いる事によって、精製・ラベル化したリガンド結合タンパク質を非特異的なラベル化を抑えつつ検出できることが明らかとなった。そこでビーズの違いによってタンパク質混在系でのラベル化効率や非特異的なラベル化反応に差異が現れるか調べる目的で、MAUra **22** を

ラベル化剤とし、Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いたタンパク質混在形中の CA ラベル化を行うこととした。非特異的吸着が多く観測される PureProteome Magnetic ビーズ（③）は今回の評価に加えず、FG ビーズ（①）および Dyna ビーズ（②）の 2 種類での評価を行った（Figure 3-18）。FG ビーズを用いた際には CA を高い効率でラベル化することができている一方で、非特異的なラベル化もある程度進行することがわかった。しかし、Dyna ビーズを用いることで CA のラベル化効率は若干低下するものの非特異的なラベル化が抑制できることがわかった。これは前節で明らかにしたように、ビーズ上に結合するリガンド結合タンパク質が多く存在するため、FG ビーズの場合と比較して CA へのラベル化が有意に進行したためであると考えている。一方で、FG ビーズを用いた場合よりもラベル化効率の低下がみられるのは粒径の違いにあると考えている。粒径が小さいほどビーズは分散性がよく、光の遮蔽も抑えることができる。すなわち Ru 光触媒担持アフィニティービーズは、粒径が大きいアフィニティービーズを使用した場合にラベル化効率が低下することを示唆する結果である。

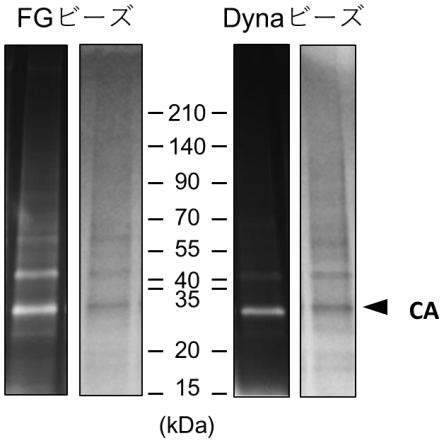


Figure 3-18. 各種ビーズを用いたタンパク質混在系中の CA ラベル化 (* Input: 1 μM CA in 3.0 mg/mL HeLa cell lysate)

3-8. リガンド連結型 Ru 光触媒および Ru 光触媒担持アフィニティービーズの比較

上記までで 2 つのリガンド結合タンパク質ラベル化法を述べた。すなわちリガンド連結型 Ru 光触媒 **39** および Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いたラベル化である。いずれを用いても近接ラベル化剤 MAUra を用いればリガンド結合タンパク質を検出することが可能であることを述べた。そこで、実際にリガンド結合タンパク質を検出・同定する目的でどちらの手法が優れているか比較を行うこととした。前節までと同様モデルタンパク質として CA を選定し、HeLa 細胞破砕液中に添加した。CA リガンド連結型 Ru 光触媒 **39** もしくは Ru/dcbpy 光触媒 **13** および CA リガンド **16** を担持したビーズを、このタンパク質溶液中に添加し、MAUra **22** によるラベル化を実施した（Figure 3-19a）。3-6 節と同様に競合阻害をかけた条件とのラベル化の比較を行い、リガンド結合タンパク質をディファレンシャル解析によって検出可能にした。リガンド連結型 Ru 光触媒 **39** を用いた場合（lane 3, 4）および Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いた場合（lane 5, 6）のいずれの場合もリガンド結合タンパク質である CA 同程度のラベル化強度で検出することに成功している。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用いた場合の方がリガンド非依存的なラベル化が抑制できることが本検討より明らかとなった（Figure 3-19b）。これは 2 章で見出した知見の通り、Ru/dcbpy 光触媒では触媒に対するタンパク質の非特異的な吸着が抑えられているためである。すなわち、Ru/dcbpy 光触媒 **13** をリガンドと連結すれば同様にリガンド非依存的なラベル化を抑制しつつリガンド結合タンパク質をラベル化することが可能であると考えられる。しかしながら、Ru/dcbpy 光触媒とリガンドを連結しようとする場合、触媒が 4 つのカルボン酸を持つことから縮合反応による連結が困難である点、親水性の高い Ru/dcbpy 光触媒がリガンド連結分子の精製を困難にするといった合成上の制限が存在する。一方でビーズに担持する手法をとれば、合成の手間をかけることなく、すでに合成済みの Ru/dcbpy アミノ化誘導体 **13** とリガンドを同時に担持するのみである。このことから、合成上の手間をかけることなくリガンド結合タンパク質を高い選択性でラベル化できる Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用いた方法の方が、リガンド結合タンパク質の検出・同定においてより実用的であると結論付けることができる。

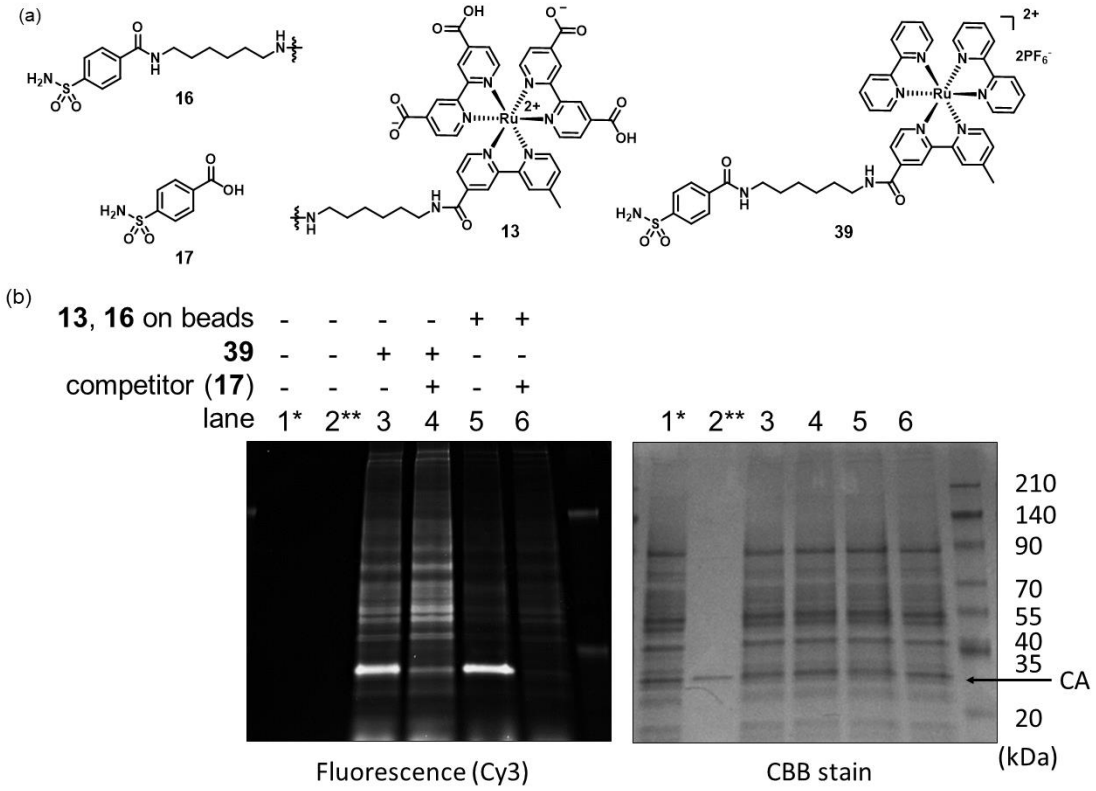


Figure 3-19. リガンド連結型 Ru 光触媒と Ru/dcbpy 光触媒担持アフィニティービーズの比較　(a) 用いた光触媒・競合剤の構造　(b) CA ラベル化の結果

3-9. 第三章のまとめ

本章では Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でタンパク質混在系中のリガンド結合タンパク質選択的なラベル化反応を行った。従来までのラベル化剤 TRT では非特異的なラベル化反応が多く進行した。しかし、ラベル化剤を最適化することで非特異的なラベル化反応を抑え、リガンド結合タンパク質を選択的・高効率にラベル化することができる MAUra を新たなラベル化剤として見出した。アミノ酸のチロシン誘導体との光反応や CV の測定から、MAUra はチロシン残基との反応効率が TRT よりおよそ 5 倍向上しており、ラベル化剤が一電子酸化を受けて生じる活性種が不安定であるため Ru 光触媒から離れた距離に位置するタンパク質への非特異的な反応が抑えられることが示唆された。この Ru 光触媒の半径数 nm 以内で高効率にラベル化することができるという MAUra の特性を活かし、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することに成功した。

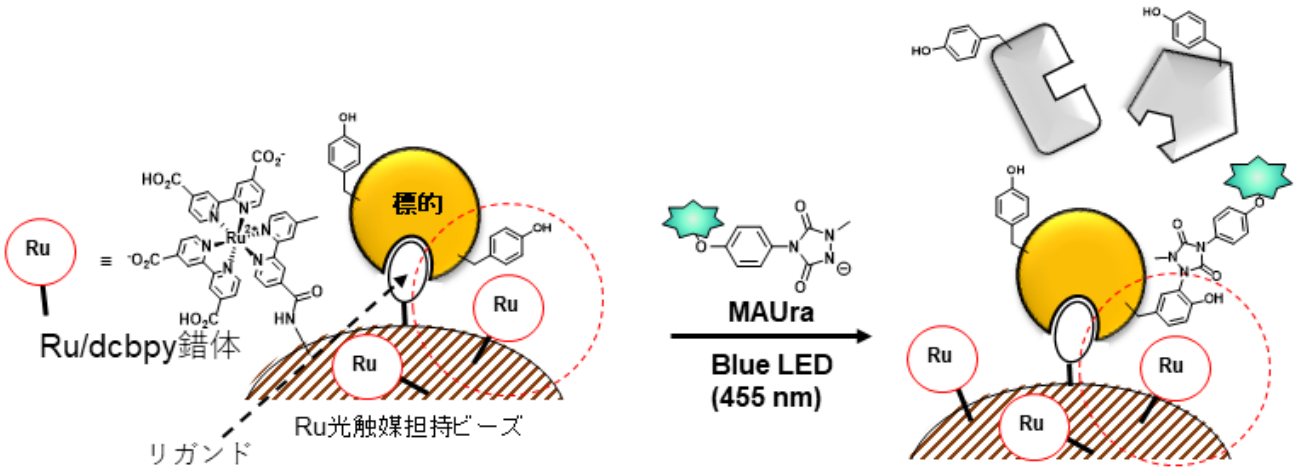
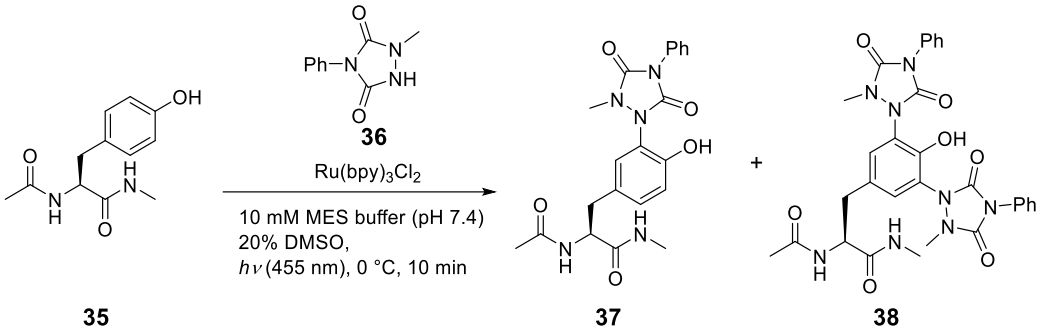


Figure 3-20. 第三章のまとめ

3-10. Referance

1. C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47−52.
2. H. W. Rhee, P. Zou, N. D. Udeshi, J. D. Martell, V. K. Mootha, S. A. Carr, A. Y. Ting, *Science* **2013**, *339*, 1328−1331.
3. 羽田野兼資 「平成 28 年度 修士論文」
4. (a) Cowan, P. C.; McGavin, S.; *Nature* **1955**, *176*, 501. (b) G. Berger, M. Vilchis-Reyes, S. Hanessian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13268.
5. Ban, H.; Gavrilyuk, J.; Barbas, C. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132,* 1523.
6. Seim, K.; Obermeyer, A.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, *133*, 16970.
7. (a) S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2633−2640. (b) S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, *Chembiochem*. **2017**, *18*, 475−478.
8. S. Sato and H. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013,** *52,* 8681-8684.
9. Bausch, M. J.; David, B.; Dobrowolski, P.; Guadalupe-Fasano, C.; Gostowski, R.; Selmarten, D.; Prasad, V.; Vaughn, A.; Wang, L. -H., *J. Org. Chem.* **1991,** *56,* 5643-5651.
10. S. Sato, K. Hatano, M. Tsushima and H. Nakamura, *Chem. Commun*., **2018**, *54*, 5871–5874.
11. (a) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963,** *2,* 565. (b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. (c) L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.* **2015**;*1*:e1500304. (d) M. Grammel, H. Hang, N. K. Conrad, *ChemBioChem* **2012,** *13*, 1112. (e) P. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi and Wu, H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030.
12. (a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 15046-15047. (b) C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, *134*, 9199–9208. (c) J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688. (d) R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.

Experimental section



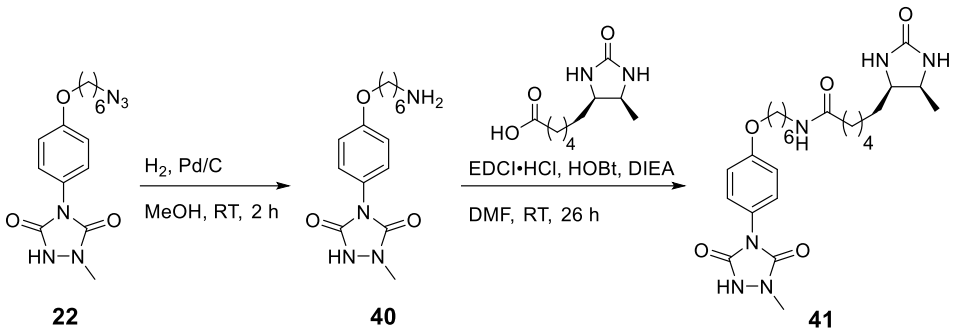
Compound 37 and 38. *N*-acyl tyrosine methylamide **35** (23.6 mg, 0.100 mmol), $Ru(bpy)_3Cl_2$ (64.1 mg, 0.100 mmol) and **36** (38.3 mg, 0.200 mmol) were dissolved in 10.0 mL of 10 mM MES buffer (pH 7.4) contained 20% DMSO. 1.0 mL of the mixture was stirred open to air at 0 °C for 10 min under irradiation with a blue light (RELYON, Twin LED light, 455 nm) in 50 mL round bottom flask. This reaction was repeated 10 times to react all of the mixture. After all of reaction, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*, the residue was dissolved in MeOH, the solution was passed through a pad of silica gel and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by PTLC with CH_2Cl_2 : MeOH = 10 : 1 and Recycle Gel Permeation Chromatography (JAIGEL-GS310, $CHCl_3$) to give **37** (21.7 mg, 51%) and **38** (2.0 mg, 3%) as white solid.

Compound 37

Mp 146-148 °C ; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.04-7.02 (m, 1H), 6.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.83-6.80 (m, 2H), 4.52 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.07 (s, 1H), 2.92-2.88 (m, 1H), 2.81-2.77 (m, 1H), 2.55 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 1.83-1.81 (m, 2H) ; ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 171.8, 171.0, 153.2, 152.7, 152.2, 131.9, 131.3, 129.4, 129.1, 128.8, 128.7, 125.9, 121.9, 118.5, 54.8, 37.6, 32.6, 26.2, 22.9; FT-IR (neat) 3309, 3102, 3079, 3013, 2941, 1765, 1704, 1651, 1541, 1515, 1505, 1433, 1407, 1304, 1159 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{21}H_{23}N_5O_5Na$ $[M+Na]^+$: 448.1591, found 448.1587.

Compound 38

Mp 168-170 °C; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.26-7.25 (m, 2H), 6.38-6.36 (m, 1H), 6.24-6.21 (m, 1H), 4.60 (quint, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.21 (s, 6H), 3.06 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.70 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H), 1.99 (s, 3H) ; ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.9, 153.8, 153.0, 131.0, 129.5, 128.8, 128.1, 126.4, 125.8, 54.5, 37.6, 33.7, 29.8, 26.4, 23.3; FT-IR (neat) 3338, 3066, 3014, 2949, 2925, 1769, 1711, 1652, 1541, 1504, 1430, 1405, 1291, 1164 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{21}H_{23}N_5O_5Na$ $[M+Na]^+$: 637.2130, found 637.2134.



Compound 41. To a solution of **22** (41.5 mg, 0.125 mmol) in 1.0 mL of MeOH was added 4.0 mg of 10% Pd/C (50% moisture content). After stirring for 2 h under H_2 at room temperature, Pd/C was removed by Celite filtration and the filtrate was concentrated under the reduced pressure to give **40**. Then, D-desthiobiotin (24.1 mg, 0.113 mmol), HOBt・H_2O (26.0 mg, 0.170 mmol) and EDCI・HCl (20.1 mg, 0.136 mmol) were added to a solution of **40** in 2.0 mL of DMF at room temperature. After stirring at room temperature for 26 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified PTLC with $CHCl_3$:MeOH = 6 : 1 and HPLC (50-100% MeOH/H_2O) to give **41** as a white solid (14.9 mg, 26%).

Mp 170-172 °C ; ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.82-3.79 (m, 1H), 3.71-3.67 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.18 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.81-1.77 (m, 2H), 1.64-1.60 (m, 2H), 1.57-1.31 (m, 12H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 176.1, 160.5, 154.9, 154.8, 128.9, 125.3, 115.9, 69.2, 57.4, 52.7, 40.2, 37.0, 33.0, 30.7, 30.3, 30.2, 30.1, 27.7, 27.1, 26.9, 26.8, 15.6; FT-IR (neat) 3293, 3079, 2932, 2860, 1698, 1515, 1432, 1248, 1222 cm^{-1}; HRMS (ESI, Negative): *m/z* calced. for $C_{25}H_{37}N_6O_5$ [M-H]$^-$: 501.2820, found 501.2816.

Preparation of NHS ester functionalized affinity beads. The 4.0 mg of Dynabeads (MyOne carboxylic acid) was washed by DMF and dissolved in 800 μL of 0.2 M NHS/DMF solution. Then, to the mixture was added EDCI・HCl (final concentration ; 20 mM), stirred for 1 h at room temperature and the beads was washed with DMF to give NHS ester functionalized Dynabeads. The beads was preserved in IPA at -20 ℃.

Preparation of Ru cat. and ligand-functionalized affinity beads. 0.5 mg of NHS ester functionalized Dynabeads was washed three times with 100 μL of DMF. To the beads in DMF was added Ru cat. (from 10 mM solution in DMF, final concentration 0.1 mM), affinity ligand (from 10 mM solution in DMF, final concentration 0.1 mM) and Et_3N (from 100 mM solution in DMF, final concentration 1 mM) (final concentration of beads: 5.0 mg/mL). After stirring for 1 h at room temperature, the supernatant was removed by magnetic separation to give the beads functionalized with both Ru cat. and affinity ligand. Then, to the reaction mixture was added 4-aminobutanol and stirred at room temperature to convert unreacted NHS ester to alcohol. The supernatant was removed by using magnetic separation, the beads was washed with Lysis buffer three times and applied next step.

Electrochemical measurement. Electrochemical measurements were made with a Hokuto-Denko HSV-110 analyzer. A three-electrode system which consists of glassy carbon working electrode, a platinum wire counter electrode and an Ag/AgCl (in saturated aqueous KCl solution) reference electrode was used. The CV measurement were performed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) and 100 μM substrate (from a 100 mM stock solution in DMSO) at room temperature. A scan rate of 100 mV/s was applied.

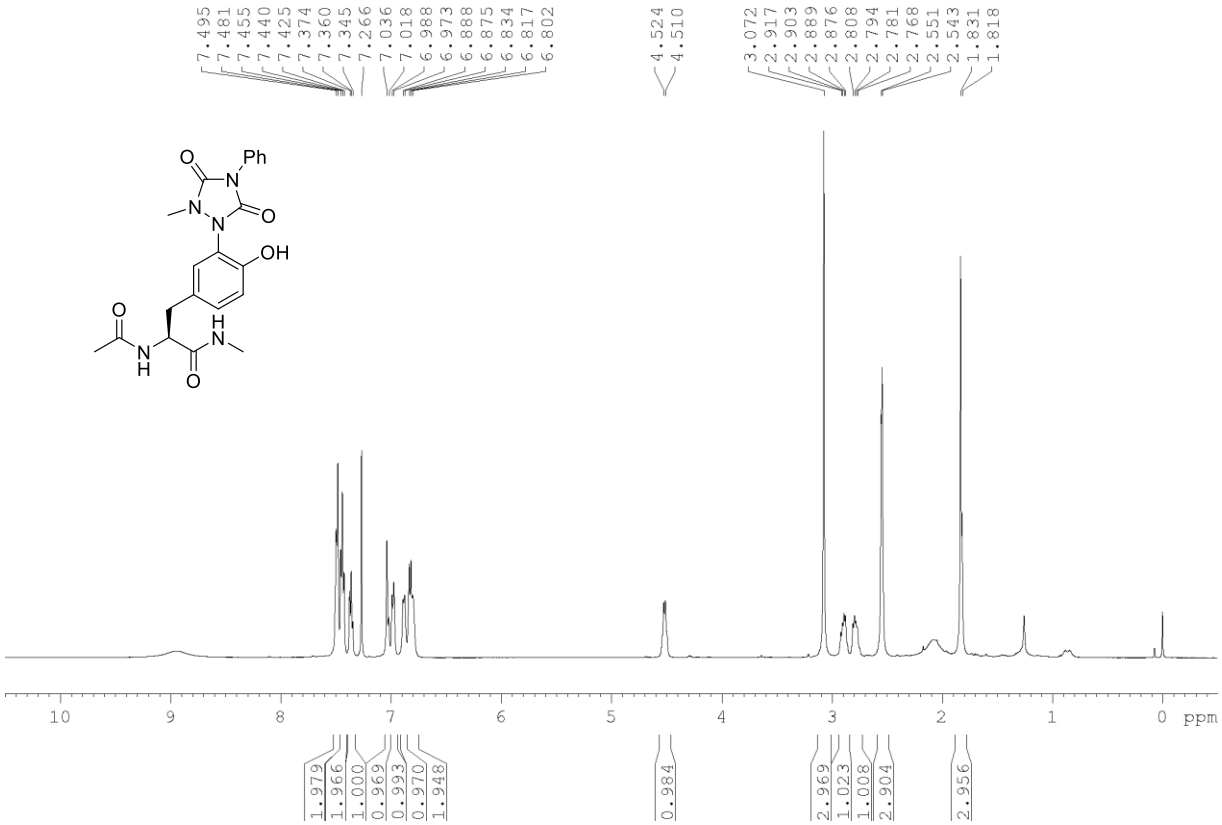
Target protein-selective labelling in HeLa cell lysate. MAUra-N_3 (**22**, from 100 mM solution in DMSO, final concentration 500 μM) and Ru/dcbpy photocatalyst-functionalized affinity beads (concentration of beads: 5.0 mg/mL) were added to the protein solution (bovine CAII (Aldrich, 1 μM) containing HeLa cell lysate (1.0 mg/mL proteins) 50 μL), and the mixture was incubated at 4 °C for 4 h. The light irradiation (RELYON, Twin LED light, 455 nm, 230 mW/cm^2) was performed on ice, 0.5 cm from the light source for 5 min. The reaction mixture was added to 2-iodoacetamide (from 100 mM solution in H_2O, final concentration 2 mM), incubated at 37 °C for 30 min. Then, low MW molecules was removed by gel filtration (GE Healthcare, Sephadex™ G-25 Medium), the filtrate was added DBCO-Cy3 (Aldrich) (from 10 mM solution in DMF, final concentration 50 μM) and incubated for 1 h at 37 °C. The resulted samples were added 5×SDS-PAGE sample buffer (final concentration: 50 mM Tris–HCl pH 6.8, 125 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol) and heated 95 °C for 5 min. After removing the beads by magnetic separation, proteins were separated by SDS-PAGE using 4-20% acrylamide gels (Biorad). Fluorescence of labelled proteins was detected with a Molecular Imager Fusion Solo S (VILBER LOURMAT). After obtaining of fluorescent image, the same gel was visualized with Coomassie brilliant blue (CBB) stain, and the image was obtained with a Molecular Imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

CA-selective labeling in HeLa cell lysate using ligand-directed ruthenium photocatalyst. To a HeLa cell lysate (1.0 mg/mL proteins, pH 7.4) was added bovine carbonic anhydrase II (Aldrich, 1 μM) and **39** (a 100 μM stock solution in DMSO, final concentration 1 μM). After incubation at 4 °C for 1 h, labeling reagent (a 50 mM stock solution in DMSO, final concentration 500 μM) were added to the solution (50 μL). The light irradiation (RELYON, Twin LED light, 455 nm, 230 mW/cm^2) was performed on ice 0.5 cm from the light source for 5 min. The reaction mixture was added to 2-iodoacetamide (a 100 mM stock solution in H_2O, final concentration 2 mM), incubated at room temperature for 30 min. Then, low MW molecules was removed by gel filtration (GE Healthcare, Sephadex™ G-25 Medium), the filtrate was added DBCO-Cy3 (Aldrich) (from 10 mM solution in DMF, final concentration 50 μM) and incubated for 1 h at 37 °C. The resulted samples were added 5 x SDS-PAGE sample buffer and heated 95 °C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE using 4-20% acrylamide gels (Biorad). Fluorescence of labeled proteins was detected with a Molecular Imager Fusion Solo S (VILBER LOURMAT). After obtaining of fluorescent image, the same gel was visualized with Coomassie brilliant blue (CBB) stain, and the image was obtained with a Molecular Imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

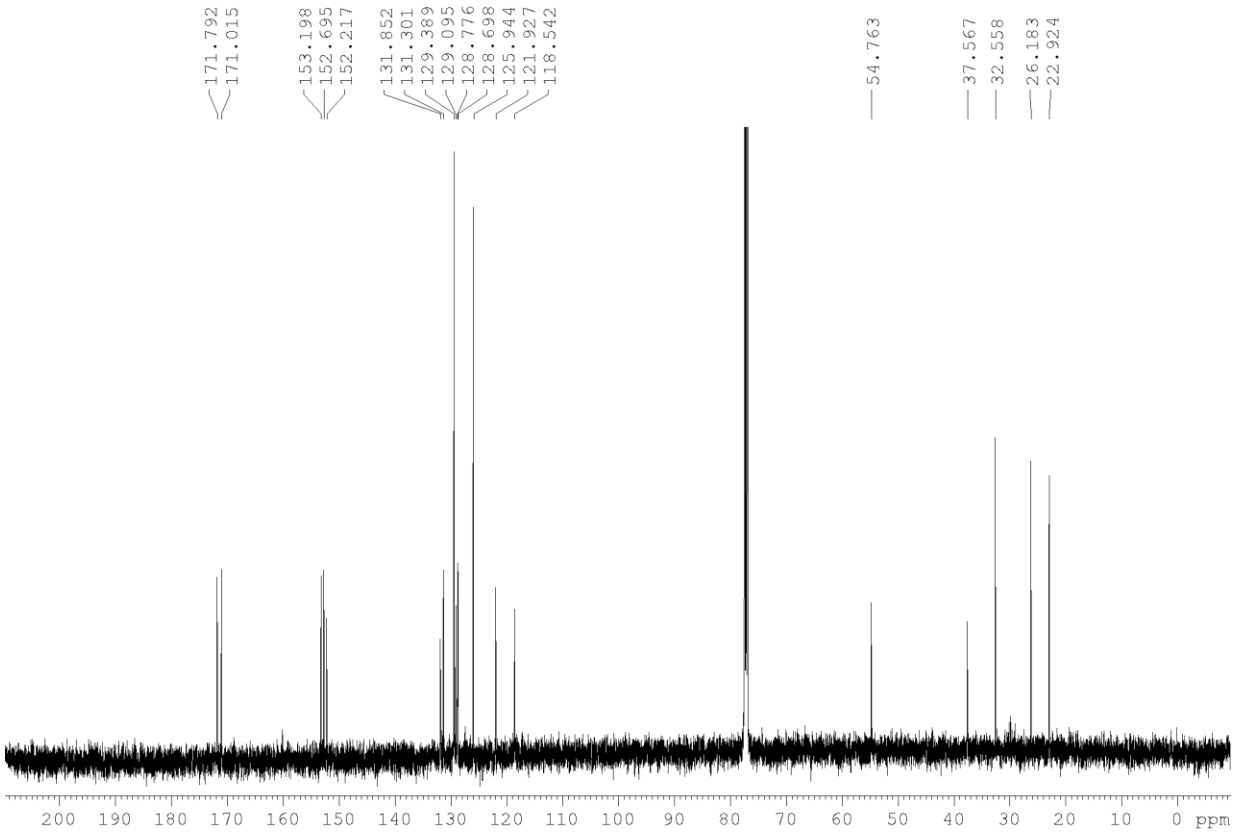
^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds

Compound 37

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

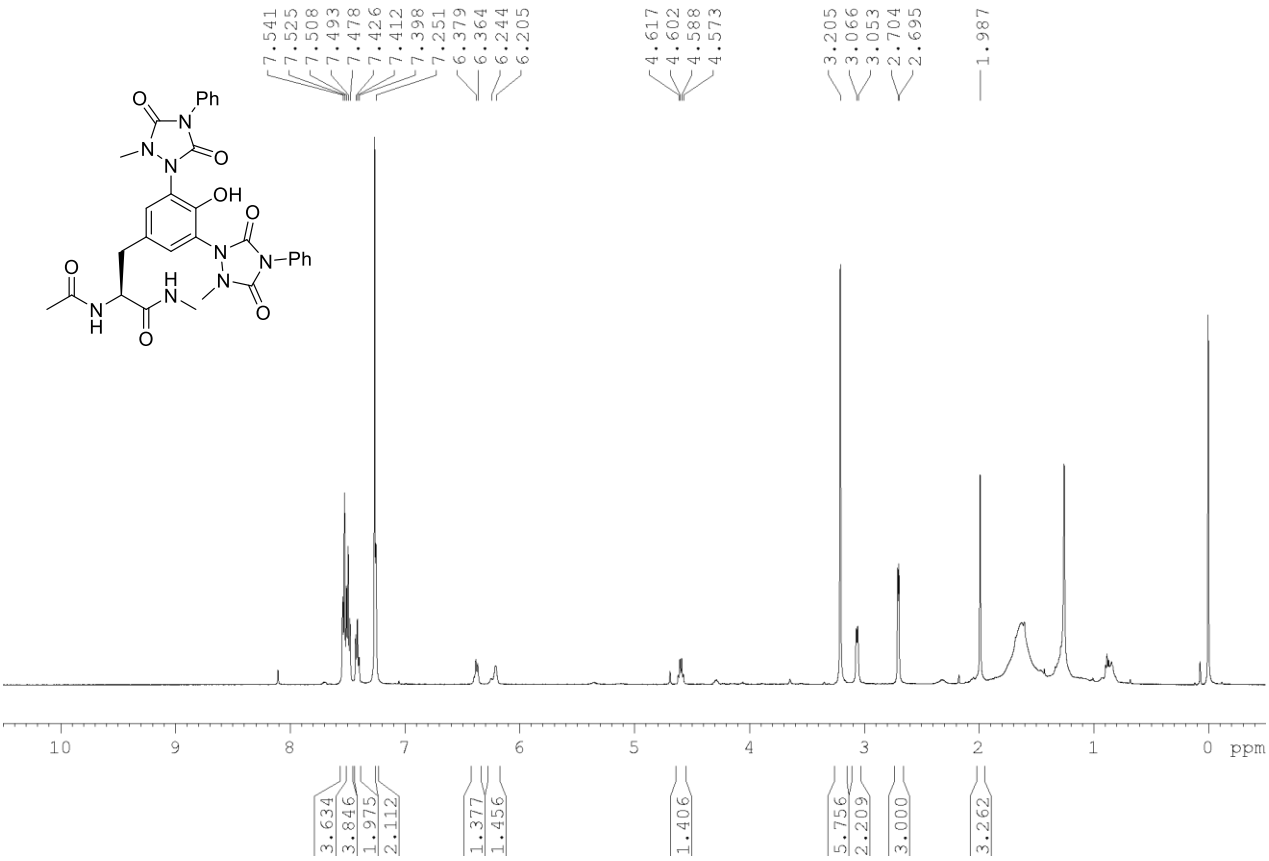


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

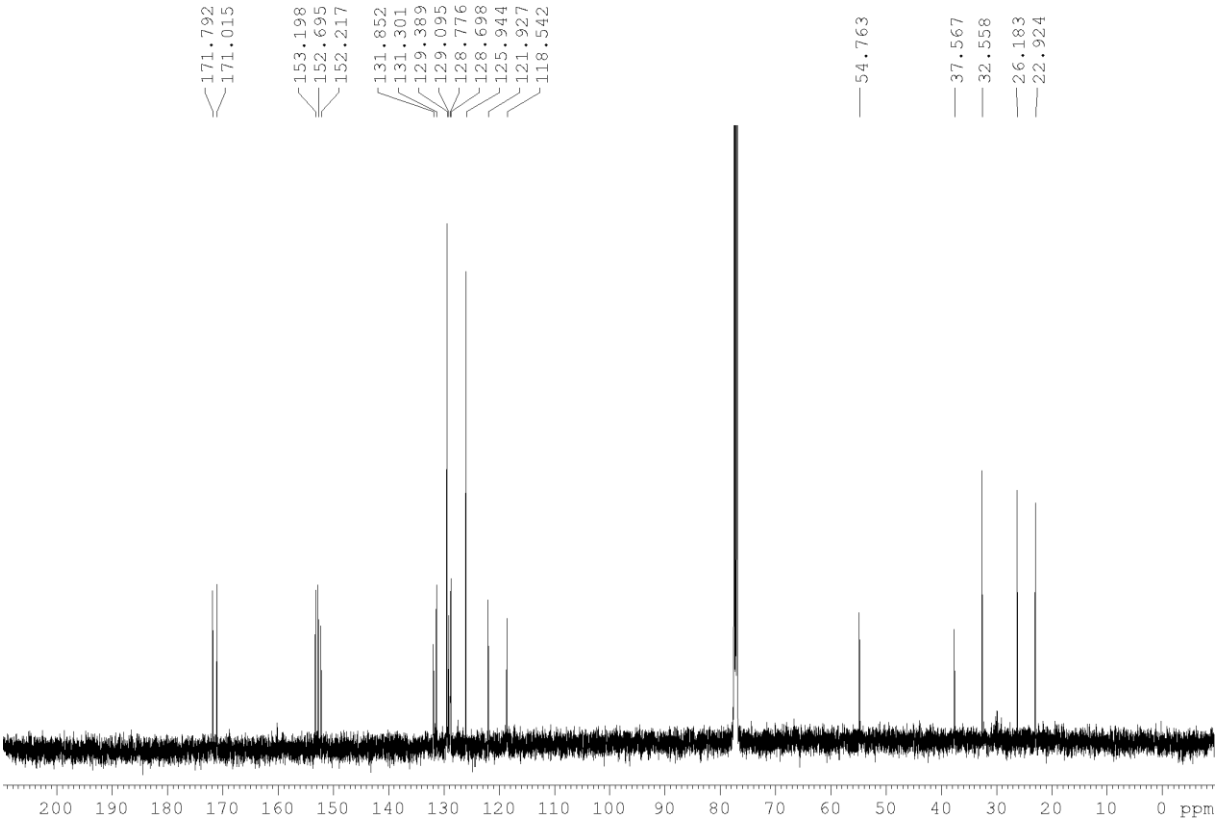


Compound 38

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

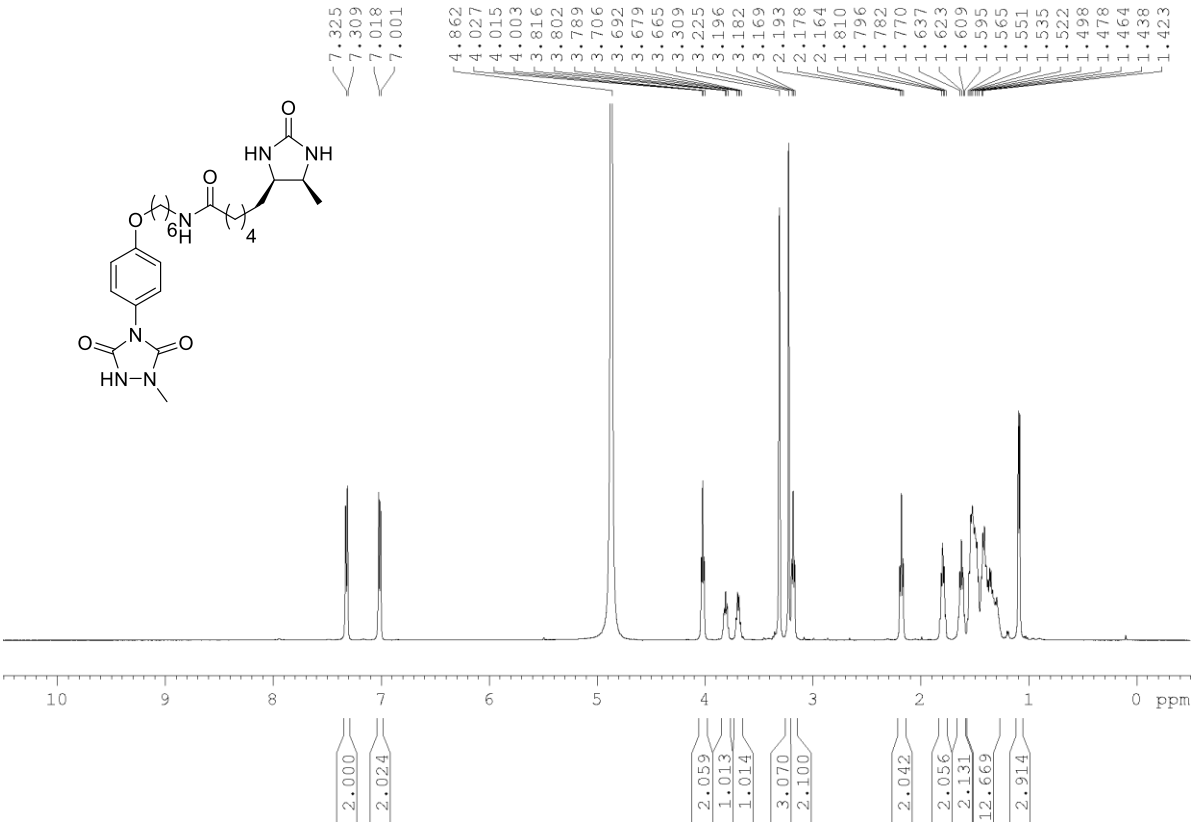


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

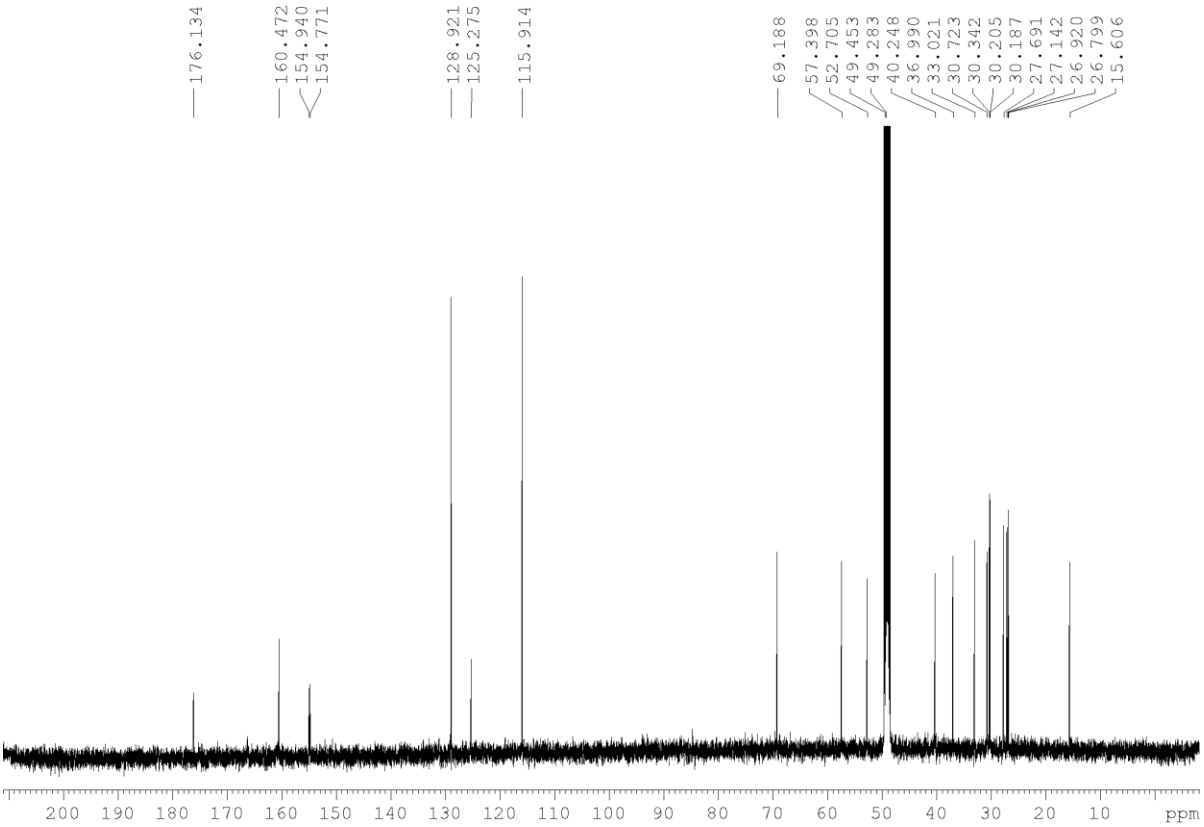


MAUra-DTB (41)

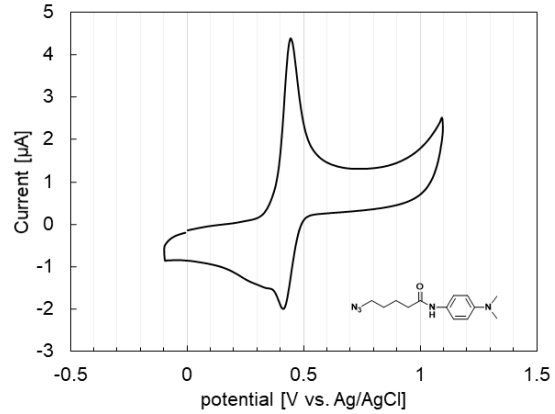
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)

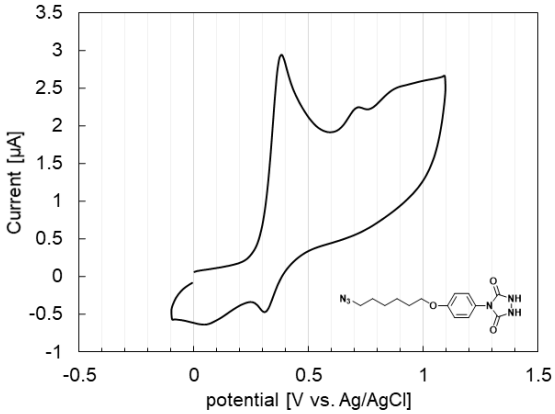


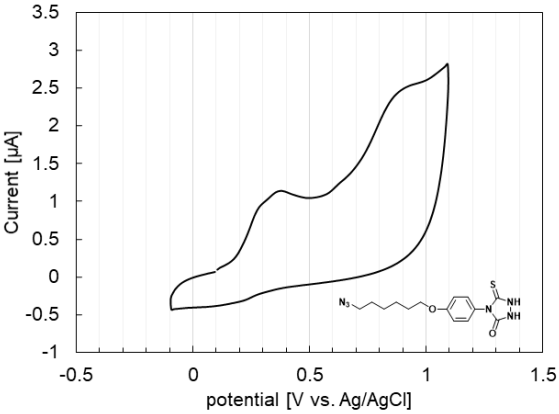
^{1}H NMR (125 MHz, CD_3OD)

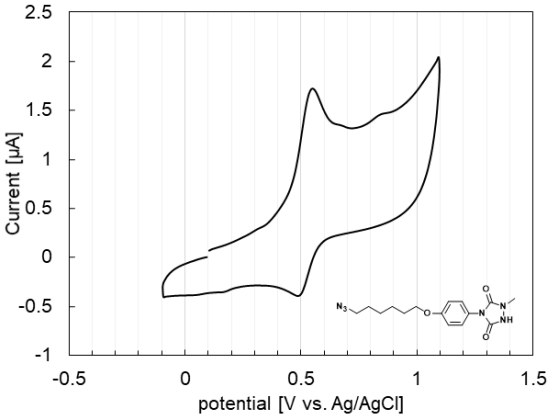


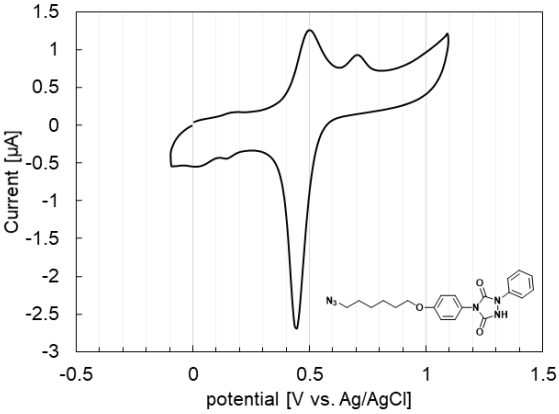
CV spectrum of compounds

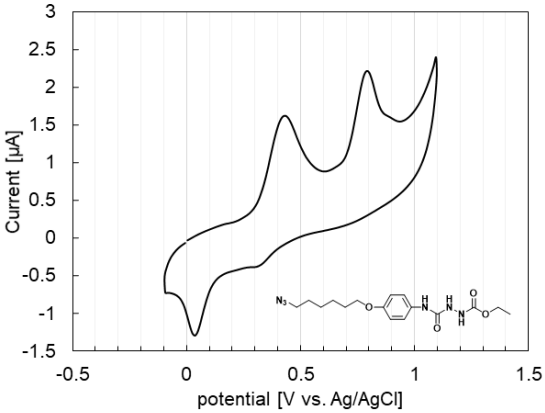


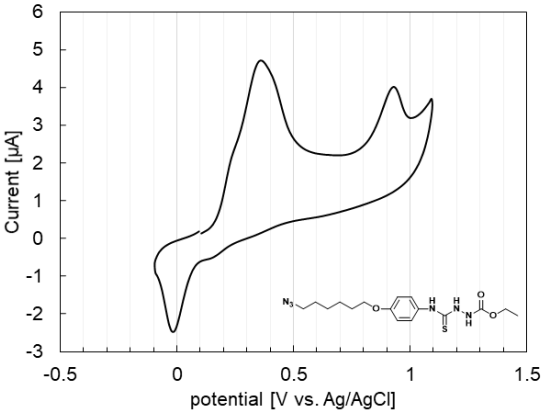


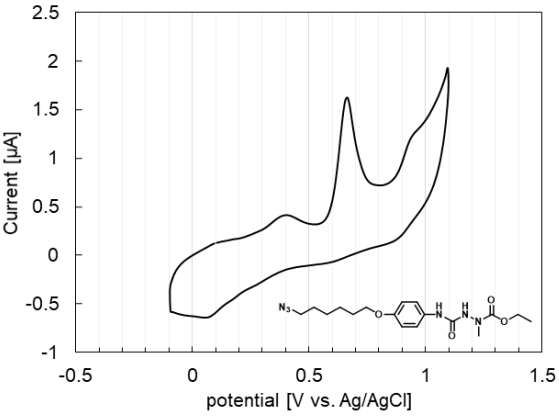


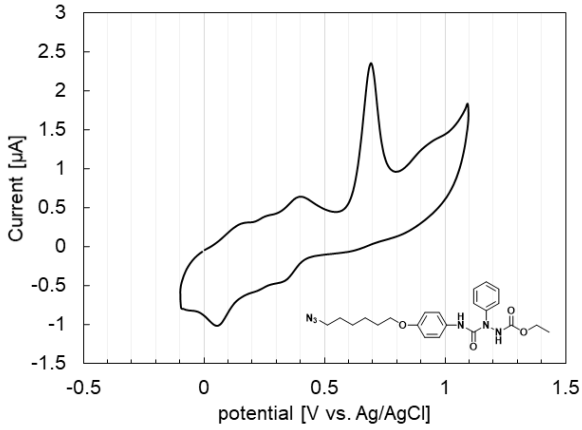


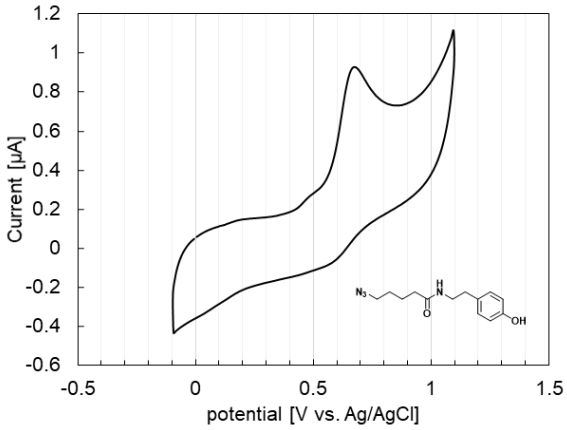


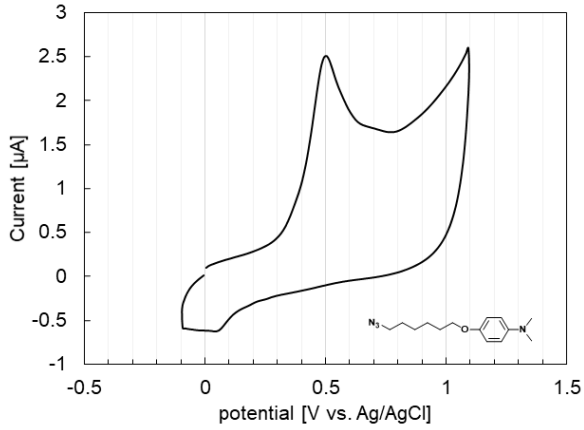


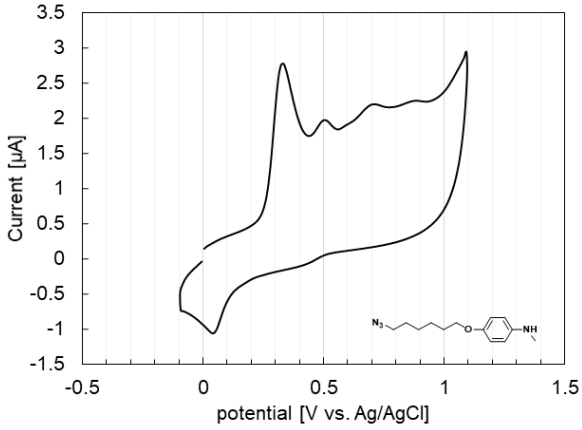


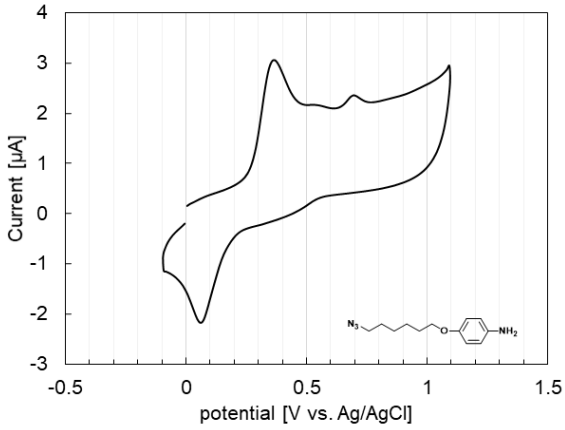


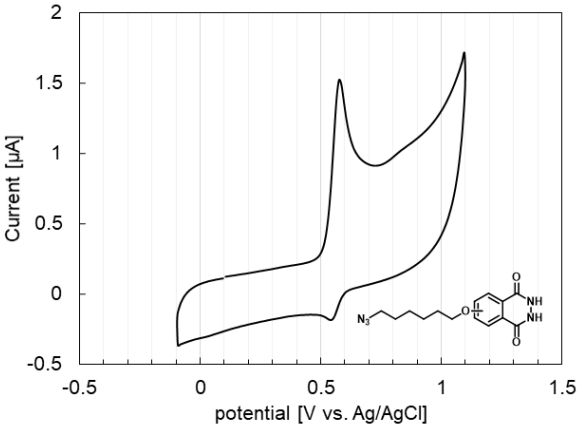

Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]

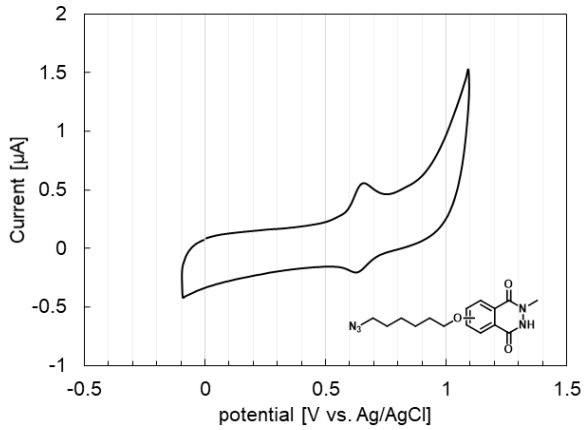

Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]

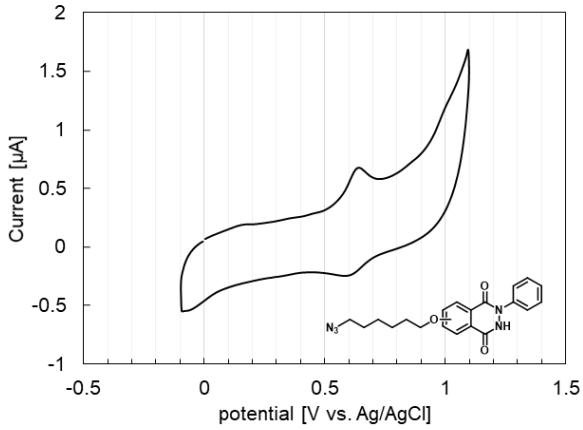

Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]


Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]

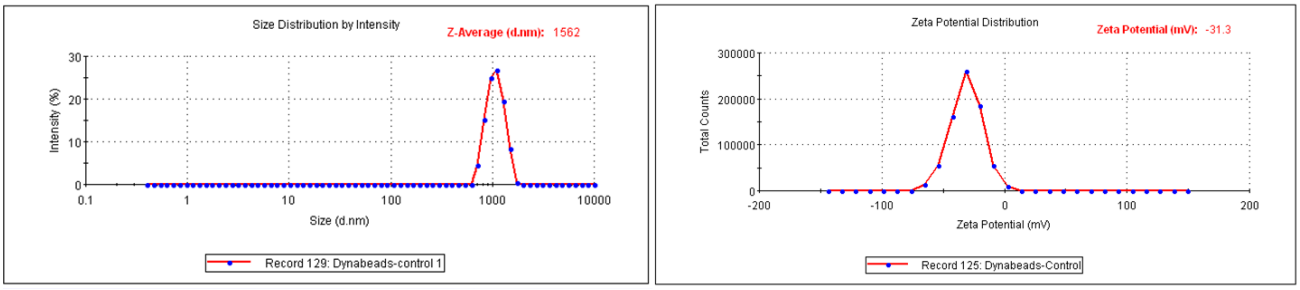

Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]


Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]

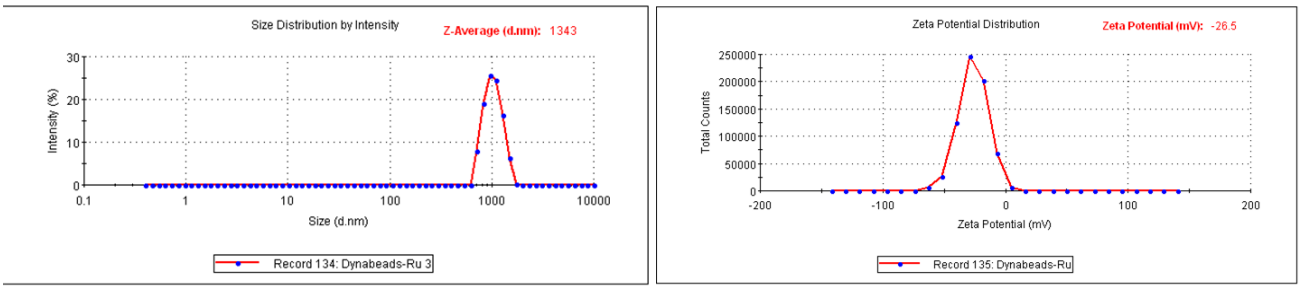

Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]


Current [μA]
potential [V vs. Ag/AgCl]

DLS spectra of Dyna beads



Size (left) and zeta-potential (right) of control Dyna beads



Size (left) and zeta-potential (right) of Ru cat. **13**-functionalized Dyna beads

第四章

弱いリガンド–タンパク質相互作用を解析可能にする光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化法の開発

4-1. はじめに

序論でも述べた通りリガンド–タンパク質相互作用の弱いタンパク質を同定するのは困難であり、アフィニティークロマトグラフィーでは $K_d < 10^{-6}$ M の親和性を持つタンパク質に解析対象が限定されることや、光親和性標識法では低い共有結合形成効率によりしばしばリガンド結合タンパク質を同定するのが困難になるという課題がある。弱い相互作用を検出・同定することができれば、未解明だったリガンド–タンパク質相互作用の解明につなげることができると期待している。さらに次章で詳細を述べるが、タンパク質–タンパク質相互作用は生体内の様々な生物学的経路にかかわる重要なファクターであるものの、その相互作用力は一般的なリガンド-タンパク質相互作用よりも弱いことが知られている。すなわち、弱い相互作用の検出が可能になれば、タンパク質–タンパク質相互作用のような弱い一過性の相互作用を検出する技術への応用も期待できる。

前章までにリガンド結合タンパク質を選択的に捕捉できる Ru/dcbpy 光触媒 **13** 担持ビーズを開発し、本ビーズ上でのリガンド結合タンパク質選択的なラベル化を達成した。本章では、この Ru 光触媒担持アフィニティービーズを用い、従来法では検出が困難なタンパク質の同定に着手することとした。具体的には、リガンド（糖鎖）–タンパク質間の相互作用が乏しいことで知られる糖結合タンパク質であるレクチンを標的とし、従来法では成しえなかった細胞内在性のレクチンの検出・同定技術の確立を目指した。

4-2. 糖結合タンパク質（レクチン）のラベル化戦略

糖結合タンパク質（レクチン）は細胞分化や細胞間接着、ウイルス性レクチンの場合には宿主細胞の認識といった機能を持つことから、レクチンの機能の解明・阻害剤の開発などは未解明の生物学的経路の解明や、ウイルス性疾患の治療において重要な役割を担う [1]。レクチンはオリゴマータンパク質であり、生体内では複数のポケットを通して糖鎖と多価に結合することでアフィニティーが向上している [2]。これを利用し、糖のデンドリマーをリガンドとした光親和性標識プローブが開発されてきている [3]。しかし、レクチンを標的とした光親和性標識法は標識効率が 10%未満であるのが通例であり [4]、この低い標識効率は細胞内在性のレクチンの検出・同定を困難にする。

そこで本章では、前章までに開発した Ru 光触媒担持アフィニティービーズおよび近接ラベル化剤 MAUra を駆使し、細胞内在性レクチンのラベル化に挑戦した。前述したようにレクチンは複数の糖鎖との多価の結合によりそのアフィニティーを向上させることができる。実際に金ナノ粒子上に担持した糖鎖がレクチンとのアフィニティーを向上させた例が報告されている [3e]。このことからアフィニティービーズ上に担持した糖鎖においても多価な結合効果を得ることができ、レクチンを強い結合力で捕捉できると期待した。そこでアフィニティービーズ上でリガンド結合タンパク質を高効率にラベル化が可能な MAUra を用いたラベル化を行うことで、一過性の糖鎖-レクチン結合を検出・同定できると考えた。

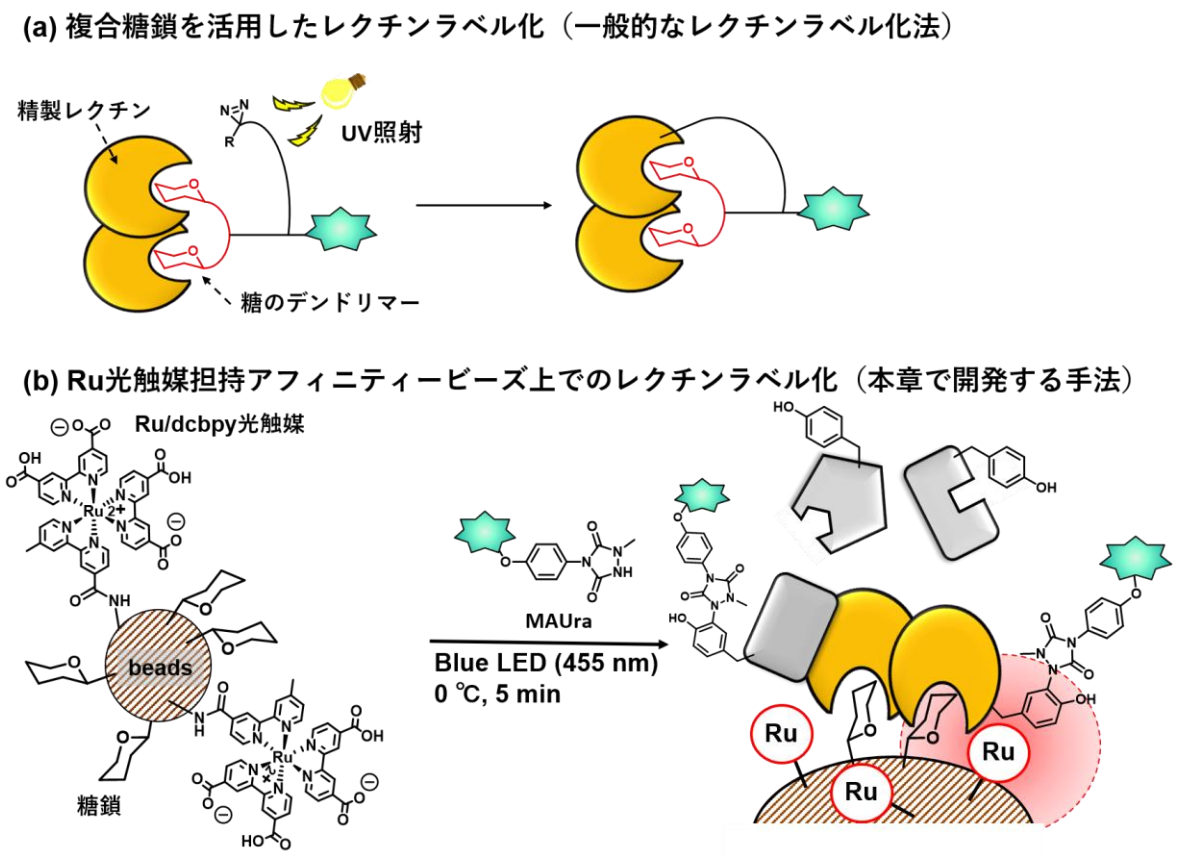
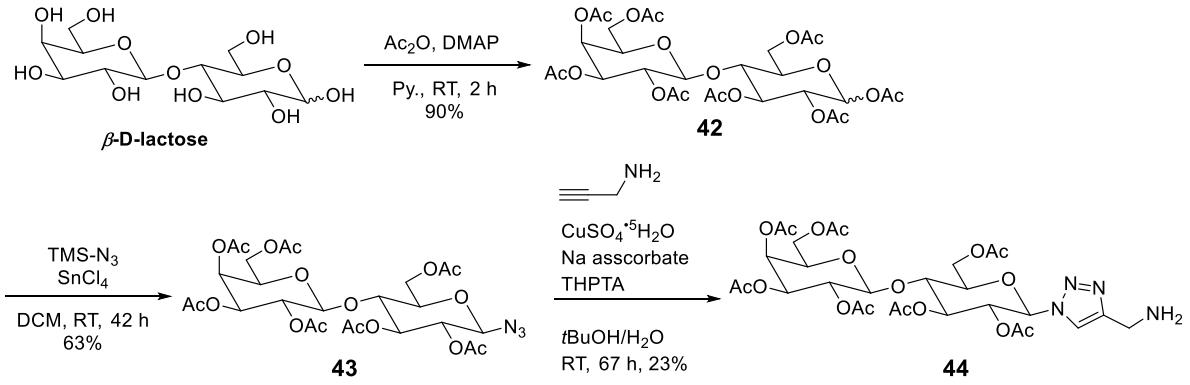


Figure 4-1. 本章の概要　(a) 糖のデンドリマーを活用したレクチンの光親和性標識法　(b) Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのレクチンラベル化

4-3. *β*-D-ラクトースアミノ化誘導体の合成

前節で述べたように、本章ではリガンド-タンパク質相互作用の弱いレクチンを標的としたラベル化を行う。コンセプト証明のために、前章でも用いていたリガンド結合タンパク質を細胞破砕液に対して人工的に添加する実験系を用いることとした。モデルタンパク質には Peanuts agglutinin（PNA）を用いることとした。PNA はピーナッツ中に含まれる四量体のレクチンであり、リガンドである*β*-D-ラクトースとの結合力は K_d = 770 μM であることが報告されている [5]。すなわち、1 μM 以下の K_d 値が必要とされるアフィニティークロマトグラフィーで検出しようとすると、洗浄操作中に解離してしまう弱いリガンド-タンパク質相互作用である。PNA をモデルタンパク質としたレクチンの捕捉・精製の検討は報告例があり、金ナノ粒子上にラクトースと光親和性標識基を同時に担持し、金ナノ粒子上にベンゾフェノンとの結合を介して PNA を捕捉することに成功している [3e]。この例からも、レクチンは非共有結合であるリガンド-タンパク質相互作用を介して精製することは難しく、共有結合形成を介した捕捉が重要であることが示唆される。

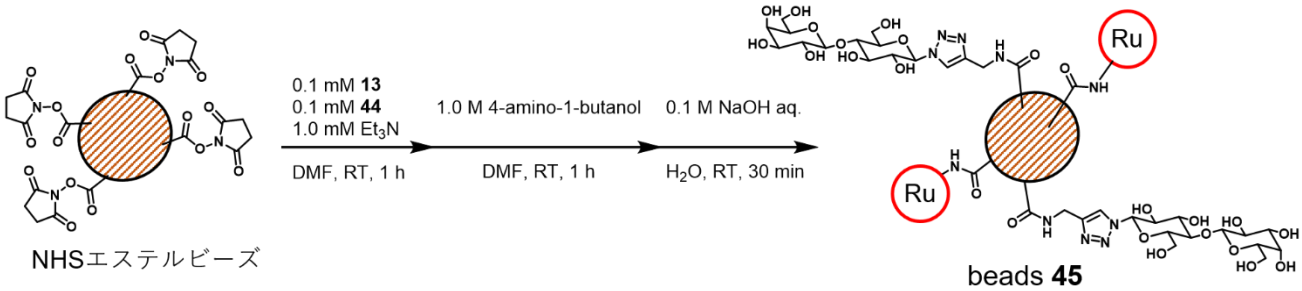
ビーズ担持のための*β*-D-ラクトースのアミノ化誘導体の合成法を Scheme 4-1 に示した。DMAP 触媒存在下、*β*-D-ラクトースのヒドロキシ基を無水酢酸によってアセチル化し、化合物 **42** を得た後に $SnCl_4$ 存在下、TMS-N_3 によるアジド化を行うことによって*β*-D-ラクトースのアジド化誘導体 **43** を得た [3e]。続いて、アスコルビン酸ナトリウム、銅触媒および活性化配位子である Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine（THPTA）存在下、化合物 **43** とプロパルギルアミンの Huisgen 環化付加反応を行うことで*β*-D-ラクトースアミノ化誘導体 **44** を合成した。脱アセチル化した糖鎖は水溶性が大きく向上するため精製が困難になるのが一般的である。そこで、ここでは化合物 **44** の脱保護は行わず、FG ビーズに担持した後、脱保護を行うことで Ru/dcbpy 光触媒・*β*-D-ラクトース担持ビーズを得ることとした。



Scheme 4-1. *β*-D-ラクトースのアミノ化誘導体の合成法

4-4. Ru 光触媒 13／β-D-ラクトース担持アフィニティービーズを用いた PNA ラベル化の検討

Ru 光触媒 **13**／β-D-ラクトース担持ビーズの作製法を Scheme 4-2 に示した。NHS エステルで表面修飾された Dyna ビーズに対して、Ru 光触媒 **13** およびアセチル化ラクトースのアミノ化誘導体 **44** を担持した後、未反応の NHS エステルを 4-アミノ-1-ブタノールでキャッピングした。続いて、化合物 **44** のアセチル基を脱保護するために 0.1 M NaOH 水溶液中でビーズを撹拌し、中和・洗浄を経て Ru 光触媒 **13**・β-D-ラクトース担持ビーズ **45** を作製した。



Scheme 4-2. Ru 光触媒 **13**・β-D-ラクトース担持ビーズ **45** の作製法

作製したビーズ **45** を用いて PNA を選択的にラベル化することができるか検証することとした。HeLa 細胞破砕液中に PNA を添加し、このタンパク質混在系中に作製したビーズを添加した。また、前章と標的が異なることから（前章: CA、本章: PNA）MAUra 以外が最適なラベル化剤になる可能性も懸念し、TRT（**19**）、チラミド（**28**）、ルミノール誘導体（**32-34**）、urazol 誘導体（**20, 22, 23**）など様々なラベル化剤を用いてラベル化の検討を行った（Figure 4-2a）。前章までと同様に、DBCO-Cy3 との SPAAC 反応によってラベル化反応を可視化した。第二章で用いていたラベル化剤 TRT では PNA のラベル化はほとんど進行しなかった（Figure 4-2b, lane 2）。興味深いことに、CA を標的とした際にはほとんどラベル化が進行しなかったチラミド **28** は、PNA を標的とした際には、低い効率ではあるものの選択的にラベル化反応が進行した（Figure 4-2b, lane 3）。これは CA と PNA での配列の違い、特にチロシン残基の位置の違いによるものと考えている。ビーズ上でラベル化される部位についての詳細は後述するが、リガンド結合ポケット付近で選択的にラベル化が進行することが明らかとなっている。そのため、リガンド結合ポケット付近の露出したチロシン残基の存在量がラベル化されやすさを決定づける要因となる。ルミノール誘導体では PNA ラベル化はほとんど進行しなかった（Figure 4-2b, lane 4-6）。CA を標的とした場合と同様に、urazole 誘導体ではラベル化反応が進行し、urazole **20** では選択性は低いものの、MAUra **22** では高い選択性で PNA をラベル化することが明らかとなった（Figure 4-2b, lane 7, 9）。**23** においてはラベル化反応がほとんど進行していないが、**23** は CV の測定を行った際に還元側のピーク値（I_{pc}）が酸化側のピーク（I_{pa}）よりも大きくなる準可逆系となることがわかっている。すなわち、生じたラジカルが直ちに別の構造へと変化してしまうため、ラベル化がほとんど進行していないと考察している。このことから、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で、MAUra をラベル化剤とすることによってレクチンを選択的・高効率にラベル化できることが明らかとなった。

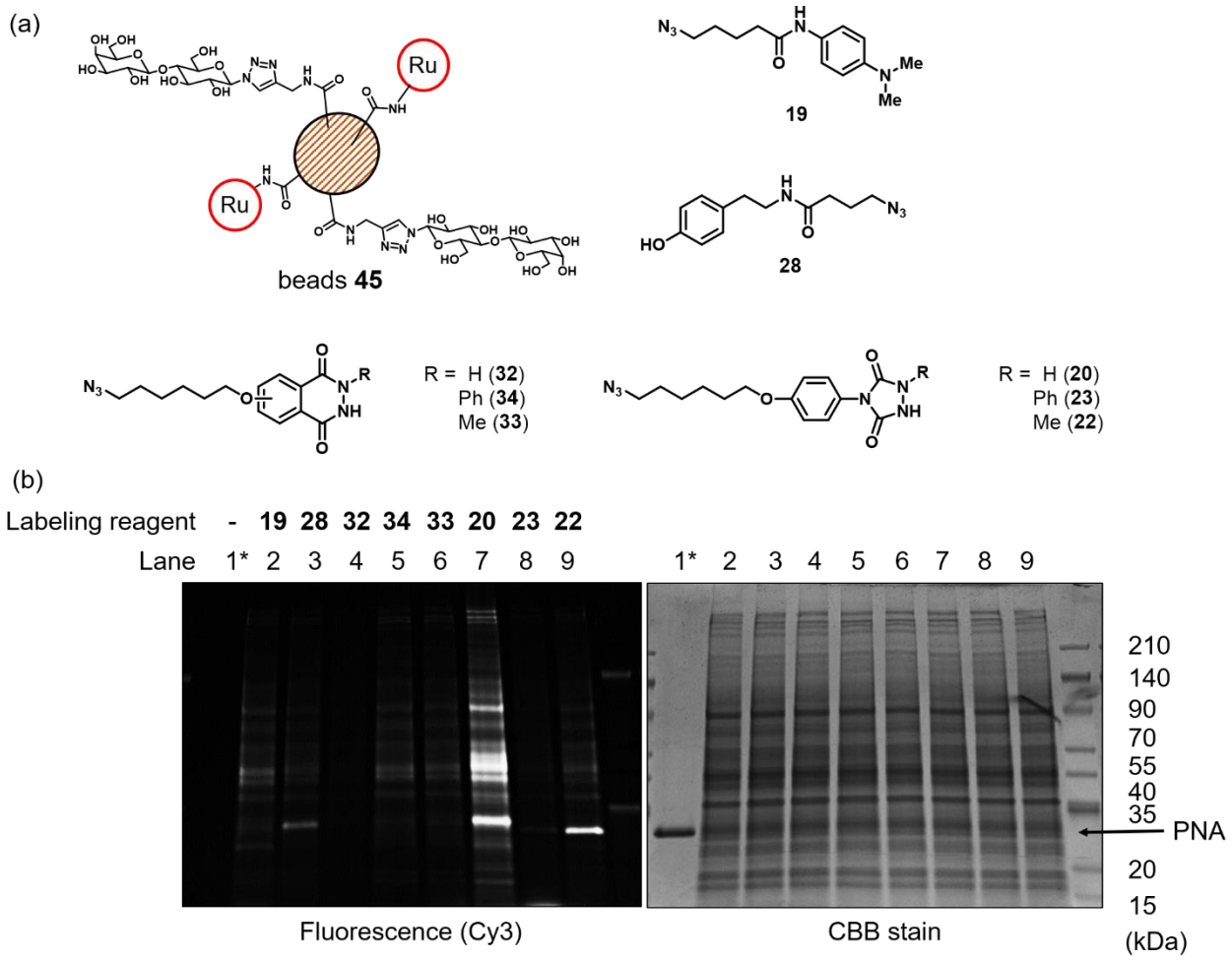


Figure 4-2. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ **45** 上での PNA ラベル化　(a) 用いたビーズおよびラベル化剤構造　(b) タンパク質混在系中の PNA ラベル化結果（*1 μM PNA）

また、本ラベル化反応がビーズ上でのラクトース-PNA 相互作用を介して進行しているか調べる目的で、リガンドを担持しない Ru 光触媒 **13** 担持ビーズ **46** やラクトースの代わりにグルコースを担持した Ru 光触媒 **13**／グルコース担持ビーズ **47** を用いた PNA ラベル化を実施した（Figure 4-3）。Ru 光触媒のみの担持や、PNA のリガンドではないグルコースを同時に担持したビーズでは、PNA に対するラベル化反応はほとんど進行していない。一方で、PNA のリガンドであるラクトースを担持した場合に PNA が高い効率でラベル化されていることから、本ラベル化反応はビーズ上のラクトース-PNA 相互作用を介して進行していることが明らかとなった。

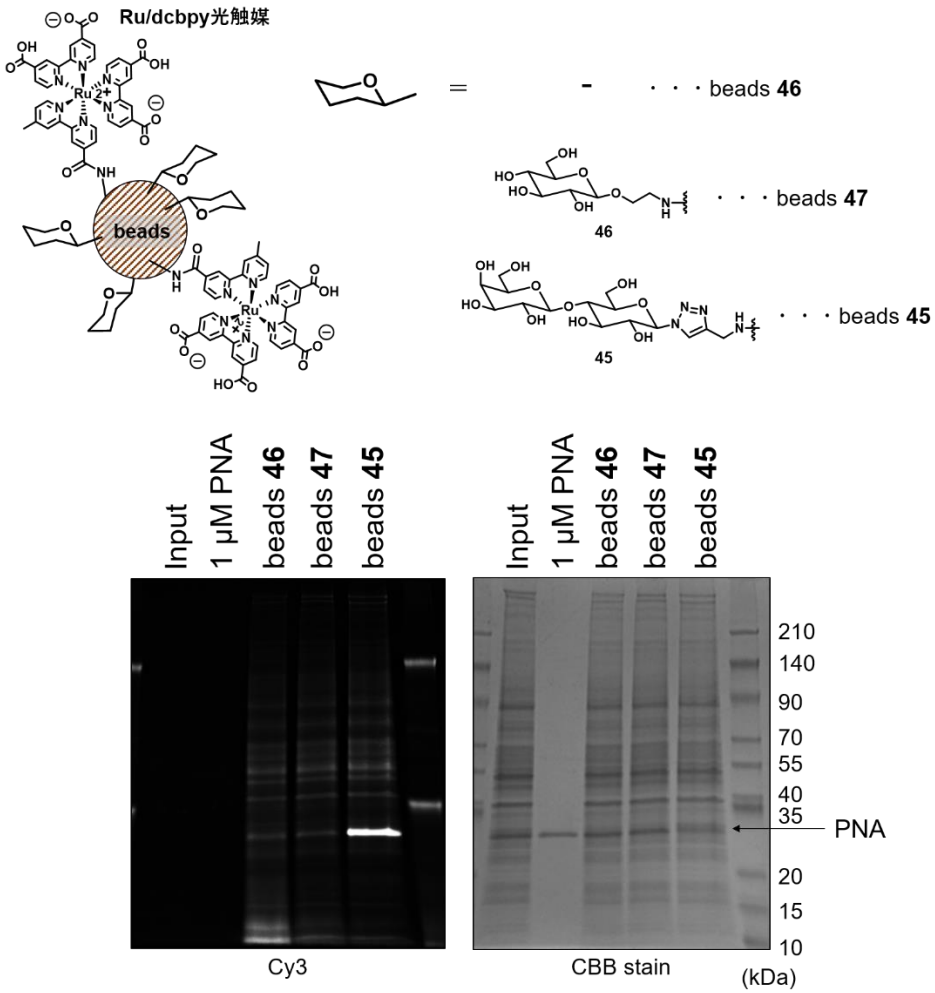
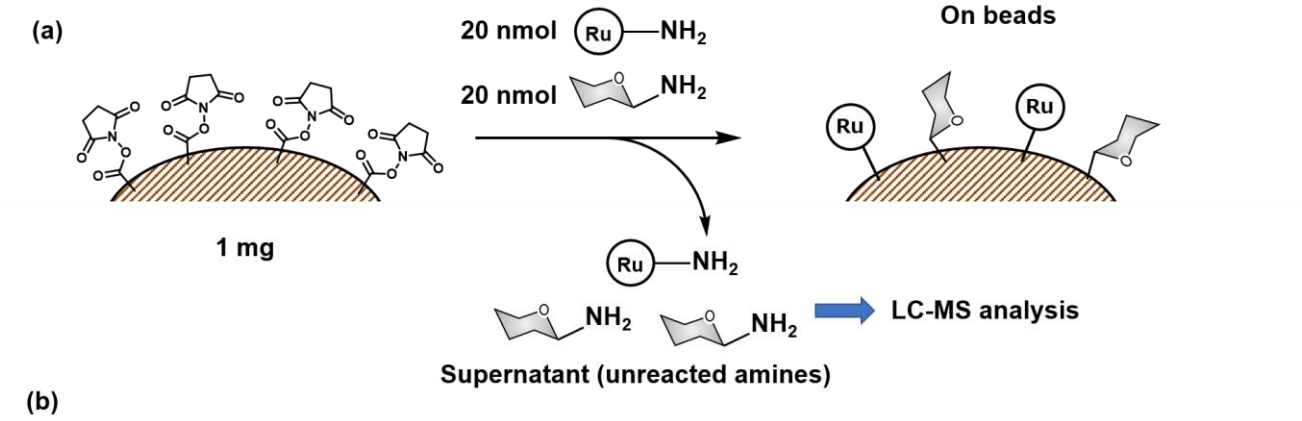


Figure 4-3. ビーズ **46**, **47**, **45** を用いた PNA ラベル化の検証（Input: 1 μM PNA in HeLa cell lysate (1 mg/mL proteins)）

4-5. Ru 光触媒担持アフィニティービーズの最適な触媒／リガンド担持比の検討

前節で、レクチンは複数の糖鎖との多価の結合によりそのアフィニティーを向上させることができることを述べた。多価な結合を介してリガンド結合タンパク質を捕捉するには、リガンド・Ru 光触媒の担持量が重要なファクターになると予想できる。すなわち、多価の結合効果を発揮するためにはリガンドである糖鎖が隣り合った環境が不可欠である。リガンドの担持量を増やせばリガンドが隣り合った環境が生まれやすい。そこで、前節までで調製した Ru 光触媒担持アフィニティービーズ **45** の Ru 光触媒・リガンド担持量を評価することとした。ビーズ上に担持された Ru 光触媒・リガンド量を評価することは困難であるため、NHS ビーズとの反応前および反応後の上清の LC-MS を測定することによって、ビーズ上に結合している Ru 光触媒・リガンドの量を見積もることとした（Figure 4-4）。Ru 光触媒 **13** およびラクトース **44** をビーズ 1 mg に対してそれぞれ 20 nmol 添加し室温 1 時間で担持した。LC-MS 解析より **13** は反応後に 0.2 nmol しか残存しておらず、ビーズ上への担持量は 19.8 nmol/mg beads となった。一方で **44** は反応後の上清に 16.2 nmol 残存しており担持量は 3.8 nmol/mg beads となった。この担持量の違いはアミンの反応性の違いや化合物の親水性や疎水性によるビーズへの近づきやすさに起因していると考えている。ビーズ **45** 上で Ru 光触媒：ラクトース ＝ 5 : 1 の担持比となっており、リガンドであるラクトースよりも Ru 光触媒の方が過剰に存在している。そのため、このビーズ担持条件では、ラクトースがビーズ表面上で隣合う確率が低いため、多価な結合効果が十分に得られていない可能性がある。そこで、最適な Ru 光触媒・ラクトース担持量の検討を行うこととした。



(b)

	total(supernatant+on beads) [nmol]	MS intensity (pre-reaction)	MS intensity (after reaction)	unreacted substrate [%]	Supernatant [nmol]	on beads [nmol]
Ru/dcbpy **13**	20	618640	5264	1	0.2	19.8
44	20	281727	228215	81	16.2	3.8

Figure 4-4. Ru 光触媒 **13** およびラクトース **44** の担持量の評価　(a) 担持量の評価方法　(b) **13**・**44** の担持量

Ru 光触媒 **13** およびラクトース **44** の添加比を変更し種々Ru 光触媒担持アフィニティービーズを作製し、前節と同様にラベル化反応を行った。興味深いことに、リガンドの担持量の増加および Ru 光触媒の担持量の増加のいずれも PNA のラベル化効率を減少させる結果となった（Figure 4-5, lane 2-4）。レクチンと糖鎖との多価な結合効果を得るためにリガンドの担持量に着目してきたが、高効率

なラベル化を実現するためには Ru 光触媒とリガンド結合タンパク質間の距離も重要なファクターとなりうる。リガンドの担持量を増やした際にラベル化効率が減少したのは、この Ru 光触媒とリガンド結合タンパク質の近接環境が生まれにくくなったためであると考えられる。一方で、Ru 光触媒の担持量を増加するとリガンド間が近接する環境が生まれにくくなる。そのため、Ru 光触媒の担持量を増やすことでラベル化効率が減少したのはリガンド間の近接環境が生まれにくくなり、レクチンを効率よく捕捉することができなくなったためであると捉えることができる。すなわち、偶然ではあるが、初期検討で用いた添加量 **13** : **44** = 1 : 1 （ビーズ担持量 **13 : 44** = 5 : 1）が Ru 光触媒-リガンド結合タンパク質間の近接環境とリガンド-リガンド間の近接環境のバランスがとれた最適な担持比であることが明らかとなった。

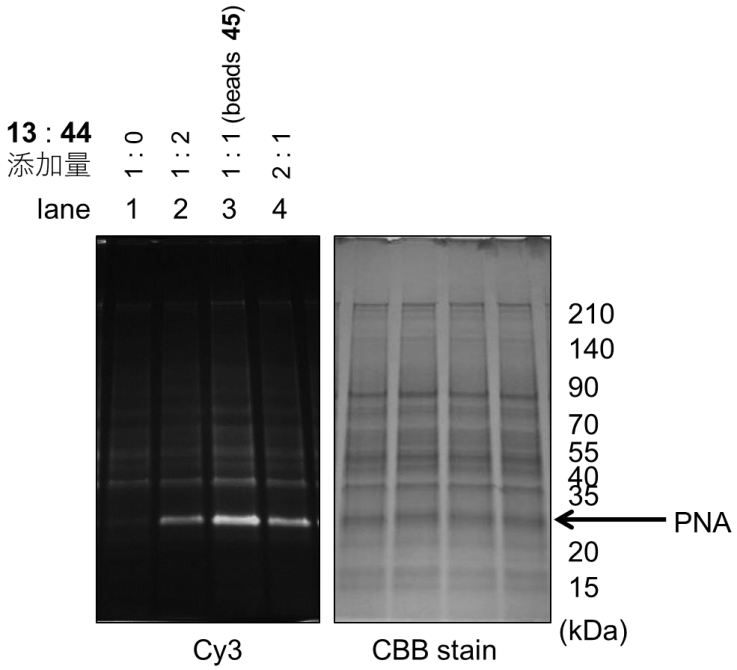
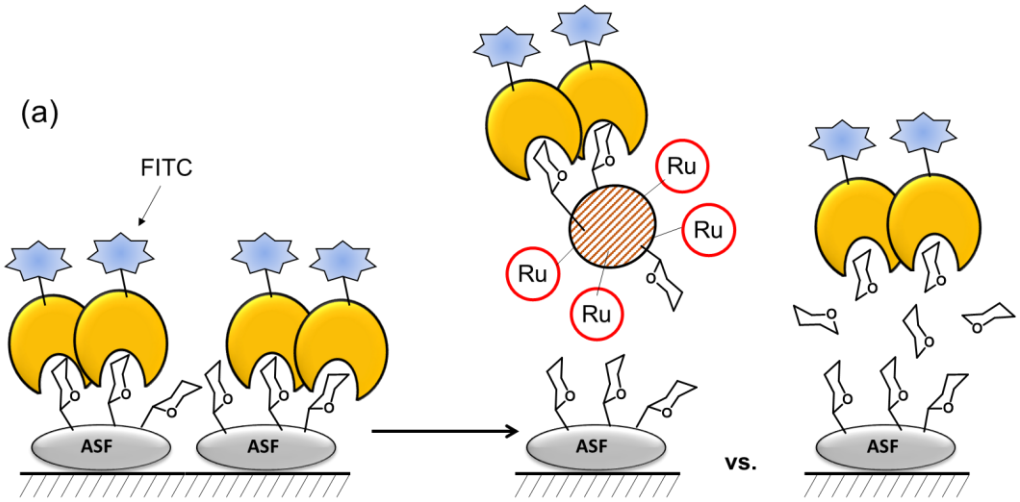


Figure 4-5. Ru 光触媒 **13** およびラクトース **44** の最適な添加比の検討

4-6. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での多価の結合効果の検証

本節では Ru 光触媒担持アフィニティービーズ **45** 上のラクトースが PNA と多価に結合しているか検証する目的で、ELISA プレート上に担持した糖タンパク質と PNA の分子認識を用いて、ビーズ **45** の PNA 結合能を評価することとした。既報の文献を参考に [6]、アシアロフェツイン（ASF）を ELISA プレートに固定した。ASF はタンパク質表面に *N*-アセチルラクトサミン構造（LacNAc）を複数有する糖タンパク質である。ブロッキング後にビーズ **45**（もしくはラクトース）および FITC 修飾された PNA を添加しインキュベートした。添加したビーズやラクトースに PNA への結合能があれば、ASF と PNA の結合が阻害される。すなわち、ELISA plate に残った FITC-PNA の量を FITC の蛍光から定量することで IC_{50} として結合能を評価することが可能である（Figure 4-6a）。フリーのラクトースを用いて ASF-PNA 結合の阻害実験を行ったところ IC_{50} = 43.7±14.4 μM となった。Ru 光触媒担持ビーズ **45** でも ASF-PNA 結合阻害実験を行った。添加するビーズの質量を種々検討し、前節で求めたラクトース担持量から（Figure 4-4）ラクトースの物質量を計算した結果、IC_{50} = 7.0±3.0 μM となり、ビーズに担持されていないラクトースと比較しておよそ 6 倍低濃度で ASF-PNA 結合を阻害できることが明らかとなった（Figure 4-6b）。すなわち、作業仮説通りビーズ **45** 上のラクトースは多価の結合によって、より強い相互作用で PNA を捕捉していることが明らかとなった。



(b)

Compound	IC_{50} [μM]
β-D-lactose	43.9±14.4
beads **45**	7.0±3.3

Figure 4-6. PNA とビーズ上のラクトースの多価結合の検証　(a) 評価方法の模式図　(b) ASF-PNA 結合阻害能の評価結果

第三章ではリガンド結合タンパク質のラベル化・検出を可能にする手法として、リガンド連結型 Ru 光触媒とラベル化剤 MAUra を組み合わせたラベル化および Ru 光触媒担持アフィニティービーズと MAUra を組み合わせたラベル化の 2 通りの手法について述べた。Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのラベル化では、ビーズ表面上にリガンドが隣り合う環境が生まれるため、多価の結合効果を得ることができる。一方でリガンド連結型 Ru 光触媒の場合には、リガンド一つに対して Ru 光触媒が連結しているため、多価な結合は生まれない。PNA 選択的なラベル化に多価の結合が関

与しているかを調べる目的で、これらのリガンド連結型触媒および Ru 光触媒担持アフィニティービーズの二手法を用い、細胞破砕液中に添加した PNA のラベル化を検討した（Figure 4-7a）。ラクトース連結型 Ru 光触媒 **49** を用いた場合は PNA がラベル化を受けているもののその選択性は十分ではなく、過剰量のラクトースを添加した際にもリガンド非依存的なラベル化反応が検出された（Figure 4-7b, lane 3, 4）。これは **49** の弱い相互作用によって Ru 光触媒のほとんどが PNA から解離していることに起因すると考えている。一方で **49** と同一の触媒構造を持つビーズ **48** では PNA のラベル化効率および選択性が向上することが明らかとなった（Figure 4-7b, lane 5）。同一の触媒構造を用いて飛躍的にラベル化効率・選択性が向上したことから、ビーズ上での多価の結合効果によって PNA の選択的・高効率なラベル化が実現できていることが裏付けられた。しかし、過剰量のラクトース添加時にもラベル化が進行しており、これは $Ru(bpy)_3$ 光触媒のタンパク質吸着性に起因するものである（Figure 4-7b, lane 6）。そこで、$Ru(bpy)_3$ 光触媒よりもタンパク質の非特異的な吸着の少ない Ru/dcbpy 光触媒を担持したビーズ **45** を用いることによって、さらに標的選択性が向上することが見いだされた（Figure 4-7b, lane 7）。過剰量のラクトースの添加によりほとんどラベル化反応が検出されておらず（Figure 4-7b, lane 8）、ビーズ上のリガンド-レクチン結合を選択的にラベル化できることが明らかとなった。

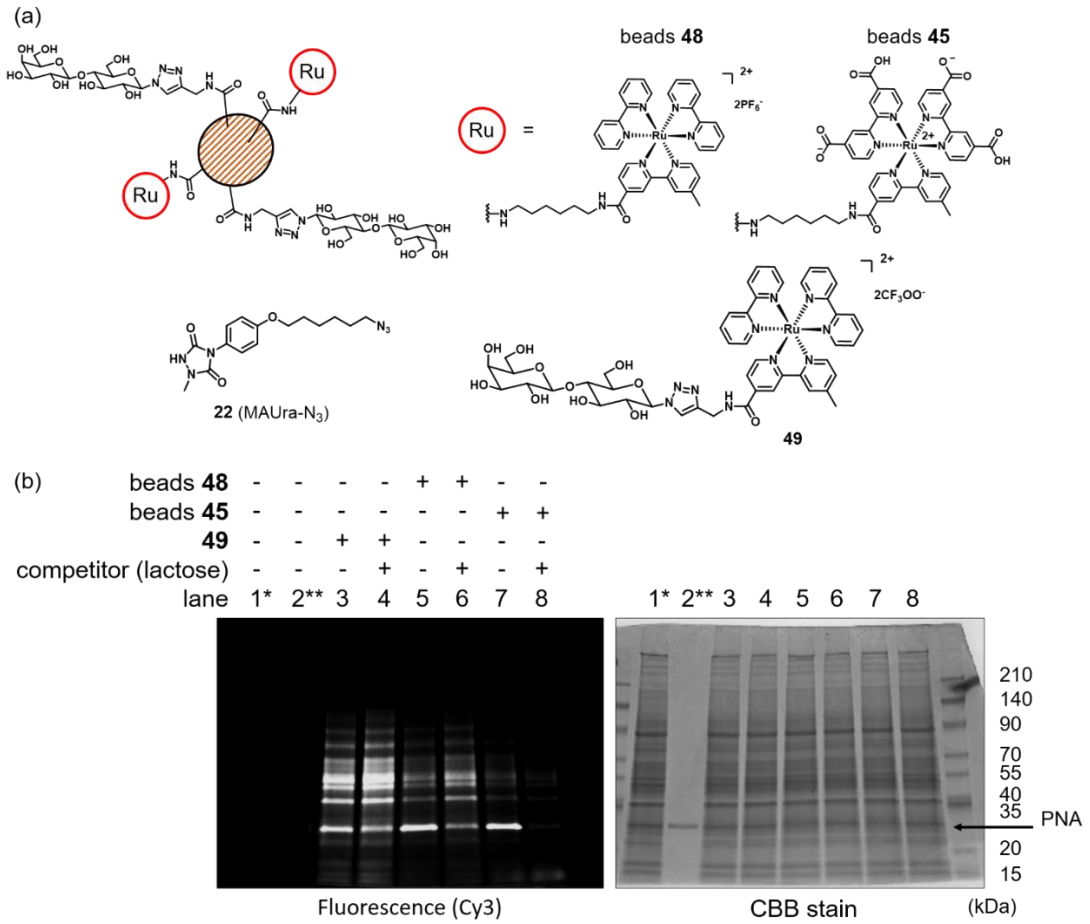


Figure 4-7. ラクトース連結型 Ru 光触媒 vs. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ （a）評価した触媒・ビーズ構造 （b）ラベル化強度・選択性の比較 （*Input: 1 μM PNA in HeLa cell lysate (1 mg/mL proteins), **1 μM PNA）

4-7. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での PNA ラベル化効率の評価

4-2 節で述べた通り、レクチンの検出・同定に汎用される光親和性標識法の共有結合形成効率は10%未満であることが通例である。Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でのレクチンのラベル化では従来法と比較して、どの程度効率向上しているか評価する目的で、PNA をデスチオビオチン連結型近接ラベル化剤 MAUra-DTB によってラベル化した。ラベル化された PNA をアビジンビーズによって精製し、ラベル化 PNA の量を評価した（Figure 4-8a, b）。ラベル化された PNA を 15 倍濃縮となるようにアビジンビーズから溶出した。SDS-PAGE 後、銀染色を行い精製前後のラベル化 PNA のバンド強度を比較したところ、ラベル化・濃縮したバンドは元の PNA 量の 3.28 倍となった。すなわち、ラベル化効率は(3.28/15)*100＝22%となった（Figure 4-8c）。この値は前述した一般的な光親和性標識法の標識効率（10%未満）を大きく上回る数値である。この結果から、本手法は一般的に用いられる光親和性標識法よりも高効率にレクチンをラベル化できることが明らかとなった。

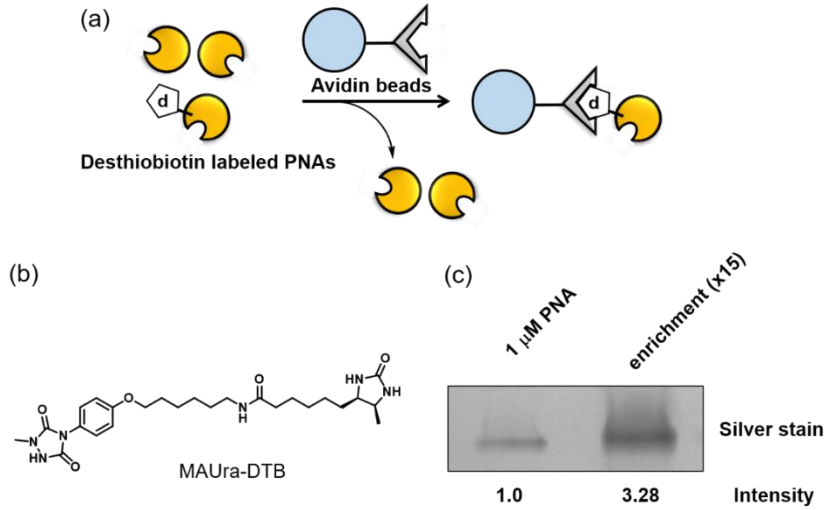


Figure 4-8. ラベル化効率の算出　（a）評価方法　（b）MAUra-DTB の構造　（c）濃縮後の銀染色

4-8. Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上での PNA ラベル化部位の評価

MAUra を用いたラベル化反応は Ru 光触媒のごく近傍で起こることを第 3 章で見出している。この微小な半径を有するラベル化によって標的選択性のみならずラベル化の部位選択性を出すことができるのではないかと考えた。リガンド結合タンパク質のラベル化・同定の用途では部位を問わずラベル化さえ受けていれば検出が可能である。そのため、本用途ではラベル化の部位選択性を有することに意味を持たない。しかしながら、部位選択性を有していれば、リガンド結合タンパク質の検出・同定以外の用途に光触媒担持ビーズ上でのラベル化を応用することができる。例えば抗体や酵素は抗原認識部位や基質ポケットをラベル化することでタンパク質の機能を損なう。部位選択的なラベル化が実現すれば、このようなタンパク質の活性に重要な部位へのラベル化を避け、タンパク質の本来の機能を損なうことなく機能化することが可能となる。すなわち、抗体-薬物複合体（ADC）やタンパク質を基盤としたバイオセンサの調製などへの応用が期待できる。そこで本節では Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で MAUra を用いたラベル化を行うことで、リガンド結合タンパク質のどの部位がラベル化を受けるのか検証することとした。MAUra-N_3 **22** を用いてビーズ **45** 上で PNA のラベル化を行い、DBCO-Cy3 との SPAAC 反応によってラベル化 PNA を Cy3 化した。ラベル化された PNA を SDS-PAGE により精製、ゲル内トリプシン消化後、LC-MS によってラベル化された消化ペプチドの蛍光検出器による検出および MS の解析を行った（Figure 4-9）。

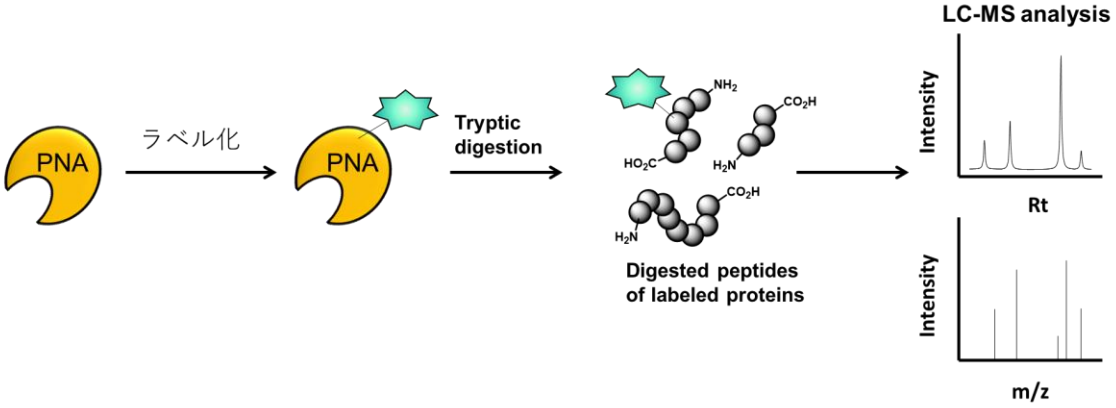


Figure 4-9. ラベル化部位の同定方法

ビーズ **45** 上でのラベル化ではメジャーな Cy3 の蛍光ピークが 1 つ検出された（Figure 4-10b）。ビーズ上での部位特異的なラベル化が達成できているか評価する目的で $Ru(bpy)_3Cl_2$ による PNA のラベル化を行い、同様の手法でラベル化部位を Cy3 の蛍光によって検出した。$Ru(bpy)_3Cl_2$ を用いたラベル化では触媒の配置がランダムとなるため、PNA の表面にあるチロシン残基のすべてがラベル化を受けうる。実際にビーズ **45** 上でのラベル化と異なり、複数の Cy3 化ペプチドが検出された（Figure 4-10d。これらの結果はビーズ上で MAUra を用いたラベル化を行うことによって部位選択的なラベル化が可能になることを示す。また、ビーズ **45** 上でラベル化を受けた PNA の残基は Y124 および Y129 のいずれかであることが明らかとなった（Figure 4-10e）。

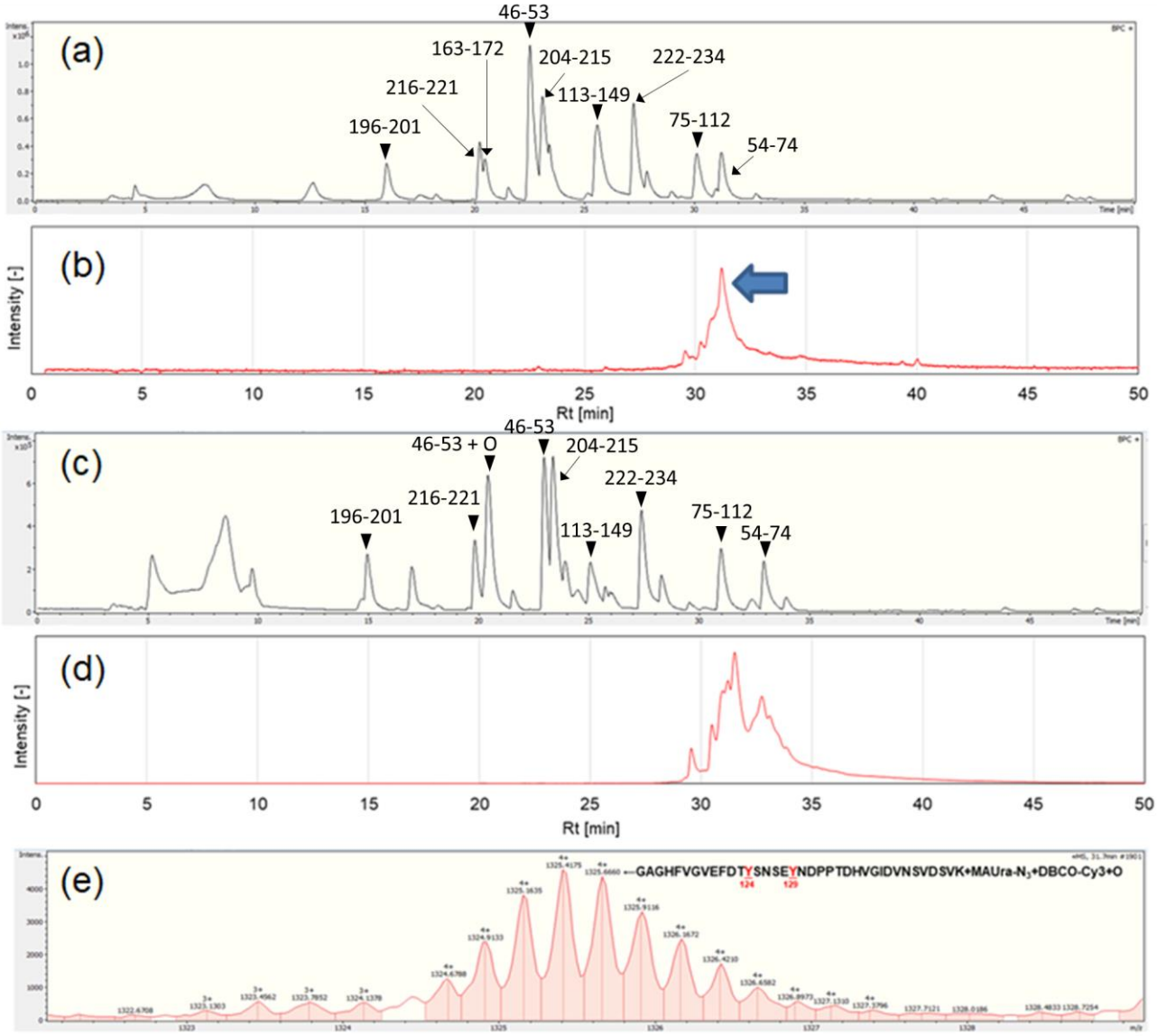


Figure 4-10. PNA のラベル化部位の同定 (a) ビーズ **45** 上で MAUra によってラベル化された PNA 消化ペプチドの TIC (b) (a)と同じサンプルの Cy3 の蛍光波長由来のピーク (c) $Ru(bpy)_3Cl_2$ 触媒下で MAUra によってラベル化された PNA 消化ペプチドの TIC (d) (c)と同じサンプルの Cy3 の蛍光波長由来のピーク (e) (b)において青矢印で示したピークの MS ピーク

ラベル化された可能性のあるチロシン残基は Y124 および Y129 はどちらもリガンド結合ポケット付近に存在することが明らかとなった。すなわち、ビーズ上で MAUra によるラベル化を行うことによってリガンド結合ドメイン付近のチロシン残基を選択的にラベル化できることが示唆された。実際に、抗体の Fc 領域結合性リガンドと Ru/dcbpy 光触媒を担持したビーズ上での MAUra によるラベル化は、抗体の Fc 領域選択的なラベル化方法へ応用展開している [7]。

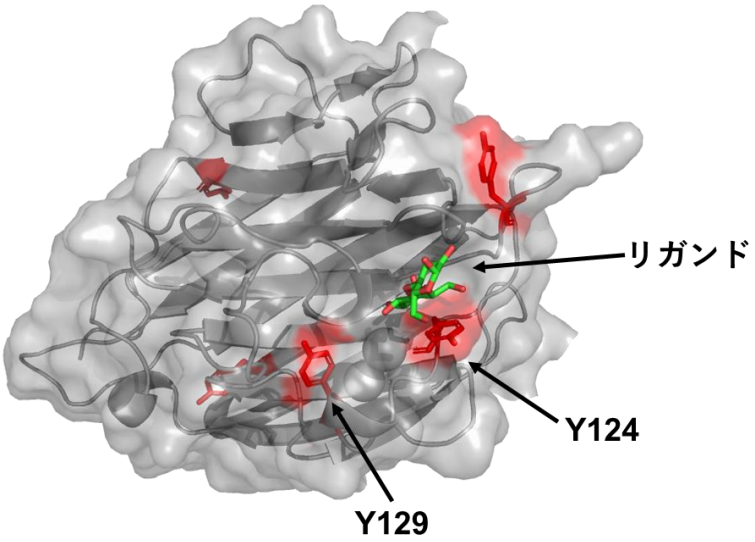


Figure 4-11. PNA の結晶構造（PDB: 2pel、チロシン残基を赤色で示した）

4-9. 細胞内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化・同定

前節までで、細胞破砕液に標的タンパク質を添加するというモデルの系ではあるものの、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で近接ラベル化剤 MAUra によるラベル化を用い、タンパク質混在系中のリガンド-タンパク質相互作用の弱いリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することに成功した。そこで本節では、さらに実用的な評価系への応用を目指し、細胞に内在するリガンド結合力の弱いタンパク質の解析を目指した。具体的には前節と同様に Ru 光触媒担持ビーズを用いて、細胞内のラクトース結合タンパク質を網羅的にラベル化する。

4-9-1. ビーズ 45 を用いた内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化検討

Ru 光触媒担持アフィニティービーズ **45** を A431 細胞破砕液中に加えた。競合阻害実験によるディファレンシャル解析を行う目的で、過剰量のラクトースと MAUra **22** を添加し光反応を行うサンプル、および MAUra **22** のみを添加して光反応を行ったサンプルを調製した（Figure 4-12）。前節まで行ったモデルの系では十分量の標的レクチンが存在したため、非特異的なラベル化をほとんど検出することなく、選択的なラベル化が達成できていた。しかし前節までのモデル系と異なり、内在性のリガンド結合タンパク質は微量であるため、存在量の多いタンパク質に対する非特異的なラベル化反応が多く検出された（lane 2, 3）。非特異的なラベル化反応は検出されているものの、競合阻害を行ったサンプルとのディファレンシャル解析により、30 kDa 付近および 15 kDa 付近にラクトース結合タンパク質と思われるバンドが検出された（lane 2 vs. lane 3）。

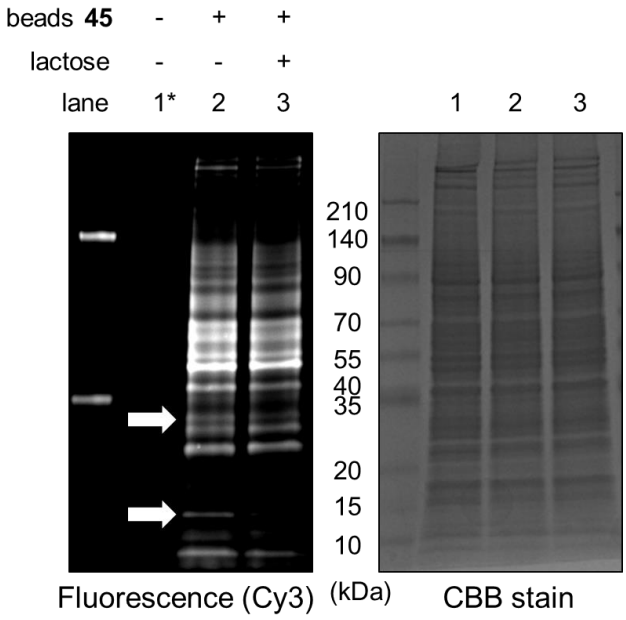
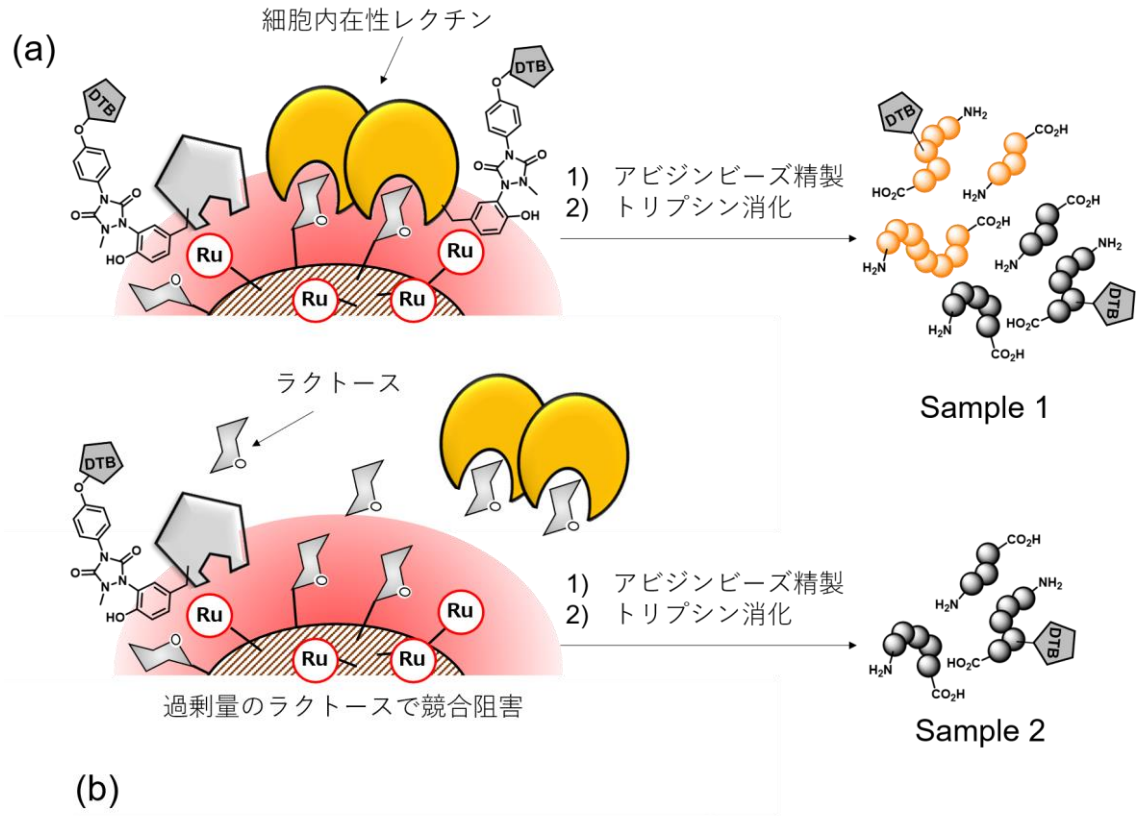


Figure 4-12. ビーズ **45** を用いた内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化検討（* Input: A431 cell lysate (3.0 mg/mL proteins)）

4-9-2. 内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化・nanoLC-MS/MS による同定

前節では内在性のラクトース結合タンパク質をラベル化により検出することができた。ラベル化されたタンパク質を同定するために MAUra-DTB によってラベル化後、アビジンビーズによってラベル化タンパク質を精製した。精製したラベル化タンパク質をトリプシン消化し、nanoLC-MS/MS 解

析を行った（Figure 4-13）。nanoLC-MS/MS 解析においても競合阻害をかけつつラベル化を行ったサンプル（sample2）および通常通りラベル化を行ったサンプル（sample1）の両者について測定を行った。sample 1 のみで検出されたタンパク質かつ peptides-spectrum matches (PSMs) ≥ 20 で検出されたタンパク質をリストアップした（Figure 4-13b）。この結果から β-ガラクトシドに結合することが知られている galectin-1（K_d = 190 μM for lactose）[8] および galectin-3（K_d = 220 μM for lactose）[9] がラベル化されていることが明らかとなった [10]。検出・同定されたペプチドの MS 強度を sample 1 – 2 間で比較すると、いずれのペプチド断片も sample 1 でのみ有意に検出されており、競合阻害を行った sample 2 ではほとんど検出されていない（Figure 4-14）。本結果は内在性のレクチンを網羅的にラベル化し同定した初の例である。nanoLC-MS/MS 解析のみでなく、精製したラベル化タンパク質の抗 galectin-1 抗体および抗 galectin-3 抗体による western-blot 解析によっても galectin-1 および galectin-3 のラベル化は裏付けられている（Figure 4-15）。ラベル化タンパク質を精製すると galectin-1 および galectin-3 がラベル化タンパク質として検出されており（lane 2）、過剰量のラクトース添加によってラベル化が阻害されている（lane 3）。このことは galectin-1 および galectin-3 がビーズ **45** 上のラクトースとの結合を介してラベル化を受けていることを裏付けている。



(b)

Description	MW (kDa)	calculated pI	Number of PSMs
Putative keratin-87 protein	29.1	5.8	112
Nucleoprotein TPR	267.1	5.0	48
Galectin-1	14.7	5.5	37
RuvB-like 2	51.1	5.6	33
Inactive tyrosine-protein kinase	118.3	7.1	26
Isoform Beta-4E of Integrin beta-4	106.7	6.3	24
Isoform 2 of Cystathionine gamma-lyase	39.5	6.9	24
Fatty acid-binding protein, epidermal	15.2	7.0	23
Keratin, type I cytoskeletal 18	48.0	5.5	22
Galectin-3	26.1	8.6	22
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	50.9	5.5	22
26S protease regulatory subunit 10B	44.1	7.5	21
Tumor protein D54	22.2	5.4	20
Integrin alpha-2	129.2	5.3	20
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	27.7	7.8	20
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	157.8	6.1	20
Nuclear migration protein nudC	38.2	5.4	20

Figure 4-13. ビーズ **45** 上で MAUra-DTB ラベル化されたタンパク質の nanoLC-MS/MS 解析 (a) ラベル化から nanoLC-MS/MS 解析を行うまでのスキーム (b) sample 1 のみで検出されたタンパク質のリスト（number of PSMs ≧20 のタンパク質を抽出、赤字：ラクトース結合タンパク質、青字：galectin の PPI パートナー）

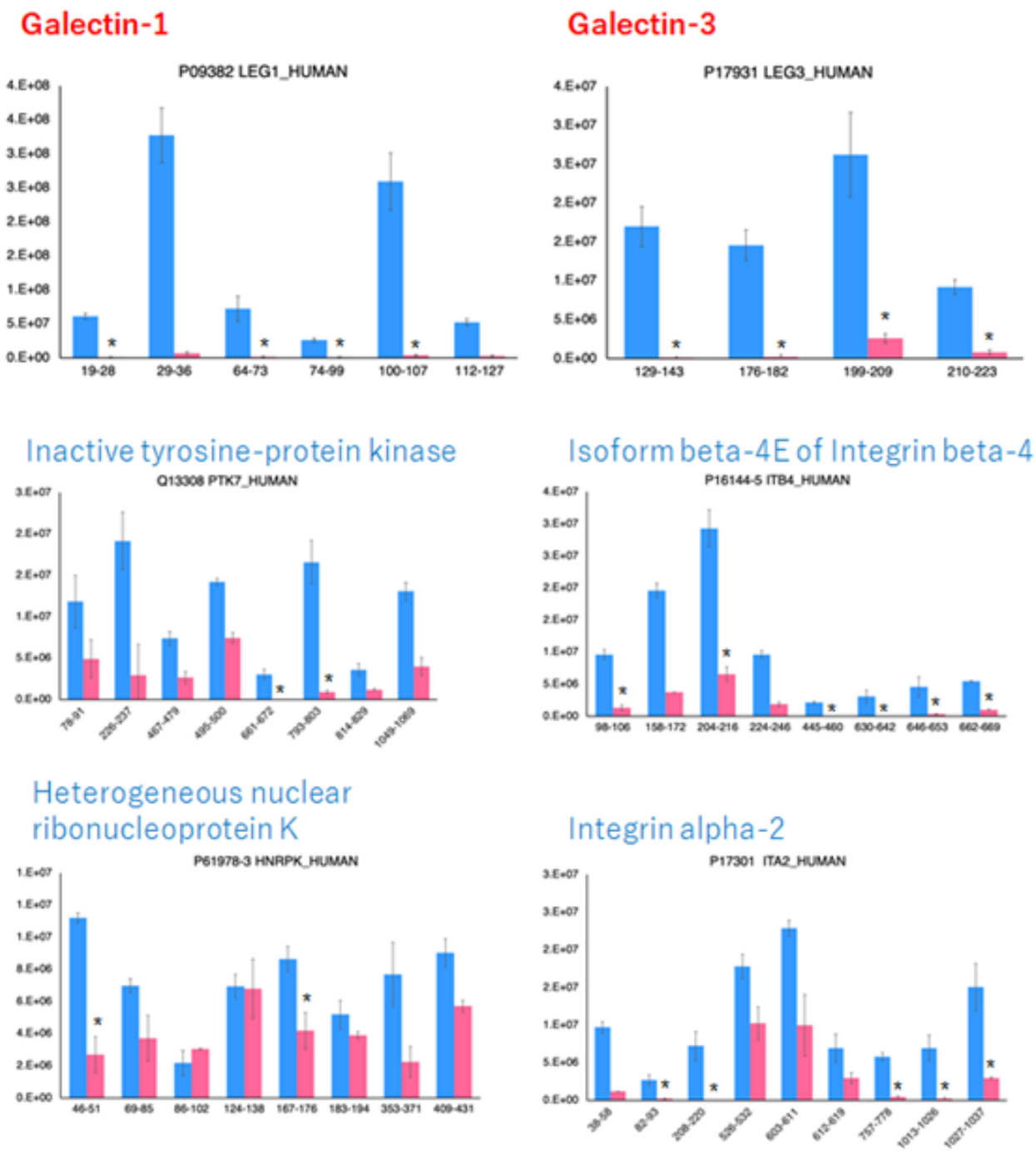


Figure 4-14. Figure 4-13 で検出された消化ペプチドの MS 強度比較（青：sample 1、赤：sample 2）

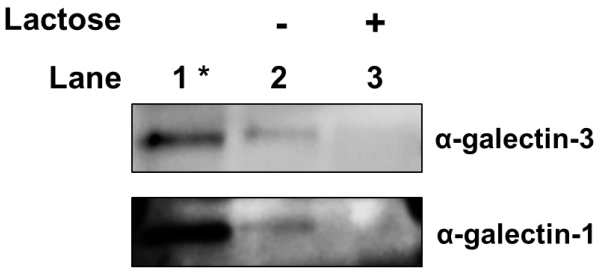


Figure 4-15. 精製したラベル化タンパク質の western-blot による解析（* 0.3 mg/mL A431 cell lysate (10 times dilution)）

また、興味深いことに、galectin-1 や galectin-3 の他に integrin や protein tyrosine kinase、heteronuclear pibonucleoprotein K といったタンパク質もラベル化を受けていることが明らかとなった（Figure 4-13b）。これらのタンパク質は galectin-3 と相互作用することで知られるタンパク質である [11]。すなわち、Ru 光触媒によるラジカル的なラベル化反応を用いれば、リガンド結合タンパク質よりも離れた位置に存在する Protein−Protein interaction (PPI)パートナーまでラベル化することができる。おそらく、PPI パートナーの場合、光触媒から距離が離れてしまうためラベル化効率は低く MS の intensity を比較すると sample 1 と sample 2 の間で intensity に有意差のある消化ペプチドが数種類観測される程度にとどまった。しかし、触媒やラベル化剤によるラベル化距離の最適化を図れば、本ラジカル的ラベル化法は PPI のプロファイリングへの応用が期待できる。実際に第五章では、光触媒の最適化を行い、PPI のプロファイリングに着手している。

ラクトース結合タンパク質として同定されてきた galectin-3 について、4-5 節と同様の方法で、ビーズ **45** 上のラクトースと多価に結合しているか調べることとした。ASF を ELISA プレートに固定し、ブロッキング後にビーズ **45**（もしくはラクトース）およびリコンビナント galectin-3 を添加しインキュベートした。次いで、His タグ抗体-Alexa488 で処理し、リコンビナント galectin-3 の持つ His タグを介してプレート上の galectin-3 を染色した（Figure 4-16a）。フリーのラクトースを用いて ASF-galectin-3 結合阻害を行ったところ IC_{50} = 3.87±1.43 mM となった。一方で、Ru 光触媒担持ビーズ **45** で ASF-PNA 結合阻害実験を行ったところ IC_{50} = 0.39±0.03 μM となり、ビーズに担持されていないラクトースと比較して 10^4 倍ものアフィニティーの向上が明らかとなった（Figure 4-16b）。10^4 倍アフィニティーが向上していることからアフィニティークロマトグラフィーによる精製ができる可能性がある。そこでビーズ **45** を用いて A431 細胞破砕液から galectin-1 および galectin-3 の pull down を行った（Figure 4-17）。検出には CBB 染色や銀染色よりも感度が高い抗 galectin-1 抗体および抗 galectin-3 抗体を用いた western blotting を用い、galectin-1 および galectin-3 の検出のみにフォーカスした。galectin-1 および galectin-3 のいずれも pull down することはできず、アフィニティークロマトグラフィーによるレクチンの精製は困難であることがわかった。すなわち、MAUra によるビーズ **45** 上でのラベル化は従来法では検出できないタンパク質を検出できる手法であることが裏付けられた。

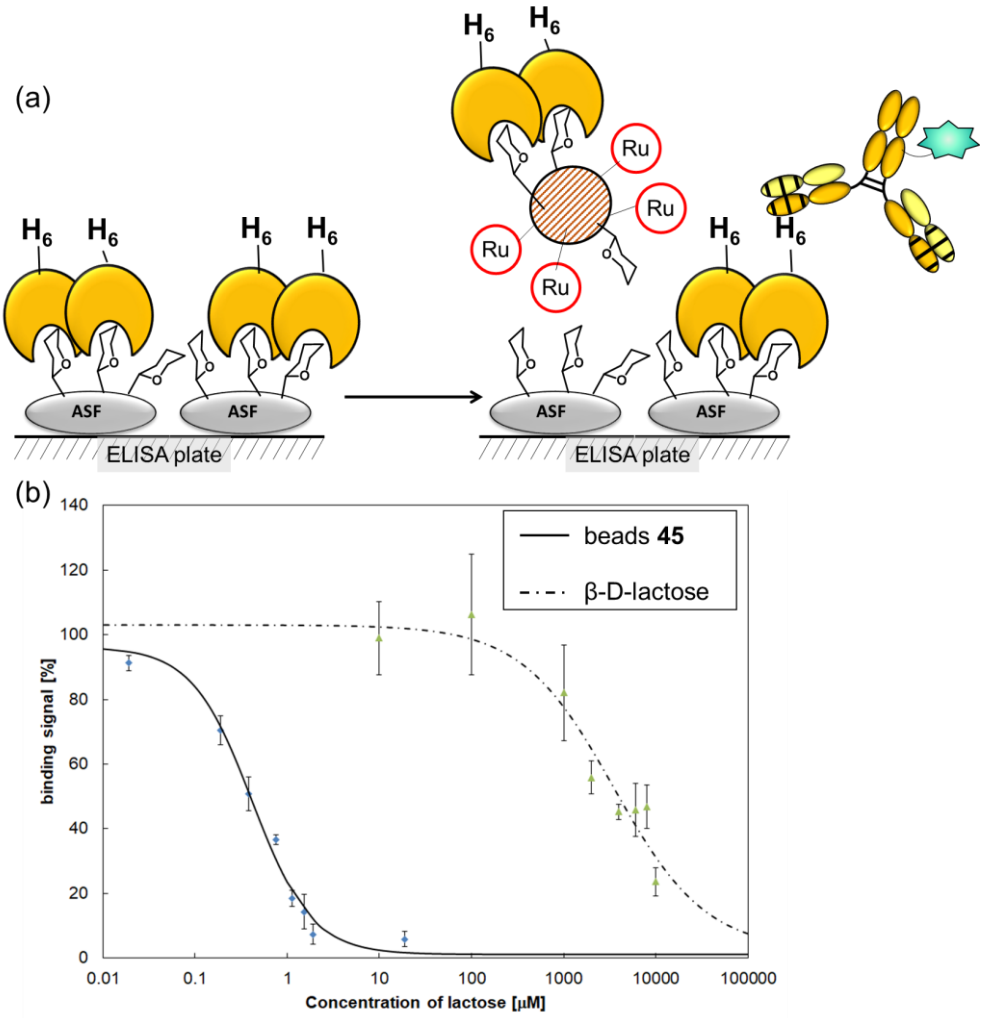


Figure 4-16. galectin-3 とビーズ上のラクトースの多価結合の検証 （a）評価方法の模式図 （b）ASF-galectin-3 結合阻害能の評価結果（IC_{50} = 3.87±1.43 mM for lactose、IC_{50} = 0.39±0.03 μM for beads **45**）

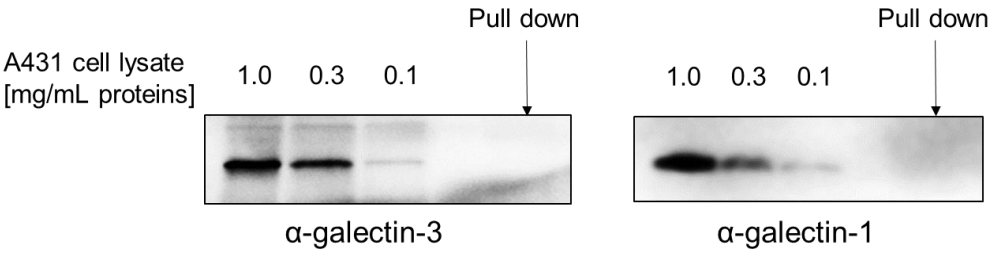


Figure 4-17. ビーズ **45** を用いた galectin-1 および galectin-3 の pull down

ビーズ **45** 上での MAUra によるラベル化によって galectin-1 および galectin-3 を同定することに成功したものの、PNA と比較しそのラベル化効率は高くない（Figure 4-15）。これは 4-8 節でも言及したように、リガンド結合ポケット付近の露出したチロシンの存在量によるものである。実際に galectin-1 および galectin-3 の結晶構造をみると、ラクトース結合ポケット付近に露出したチロシンは存在しておらず、トリプトファンやヒスチジンがポケット付近に存在している（Figure 4-18）。リガンド結合ポケット付近にチロシンがないにもかかわらずラベル化を受けた要因は次の 2 つが挙げられる。

①galectin-1 および galectin-3 のラクトース結合ポケットから離れたチロシンがラベル化を受けた
②リガンド結合ポケット付近に存在するトリプトファンもしくはヒスチジンがラベル化を受けた

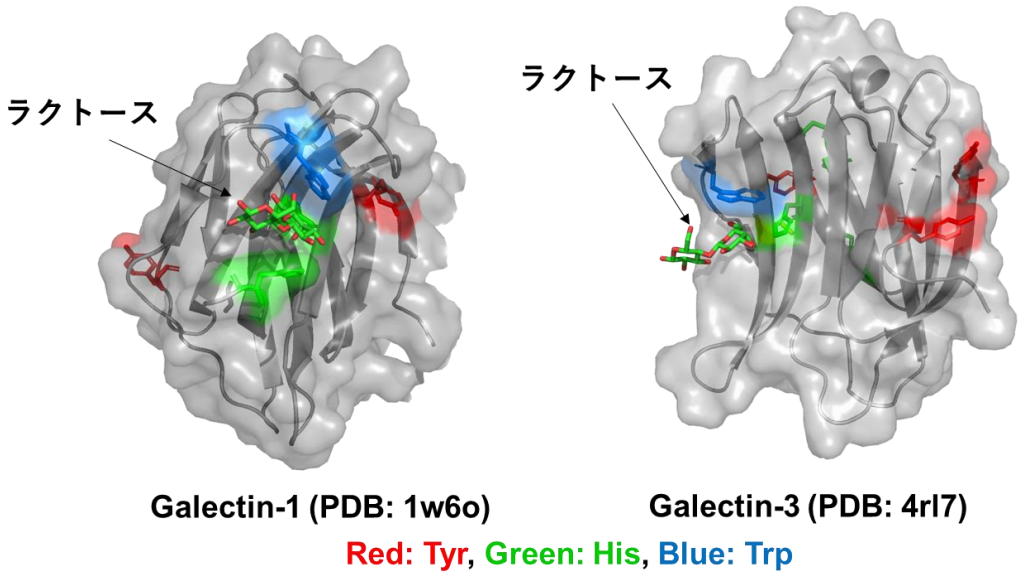


Figure 4-18. Galectin-1 および galectin-3 の結晶構造

②については $Ru(bpy)_3$ 光触媒-アミノ酸残基連結分子（Ru-Tyr、Ru-Trp、Ru-His）を用いたラベル化の検討により、$Ru(bpy)_3$ 光触媒を用いた近接ラベル化ではわずかながらトリプトファンもラベル化されることが明らかとなっている（Figure 4-19）。上記 2 つの要因は galectin-1 および galectin-3 のラベル化効率が高くない理由とも合致する。galectin-1 や galectin-3 がラベル化を受けたという結果は、リガンド結合ポケット付近にチロシンを有していなくてもラベル化反応が進行するということを示しており、チロシンを有した標的に限らず様々なリガンド-タンパク質相互作用を網羅的に同定可能であることが示唆された。

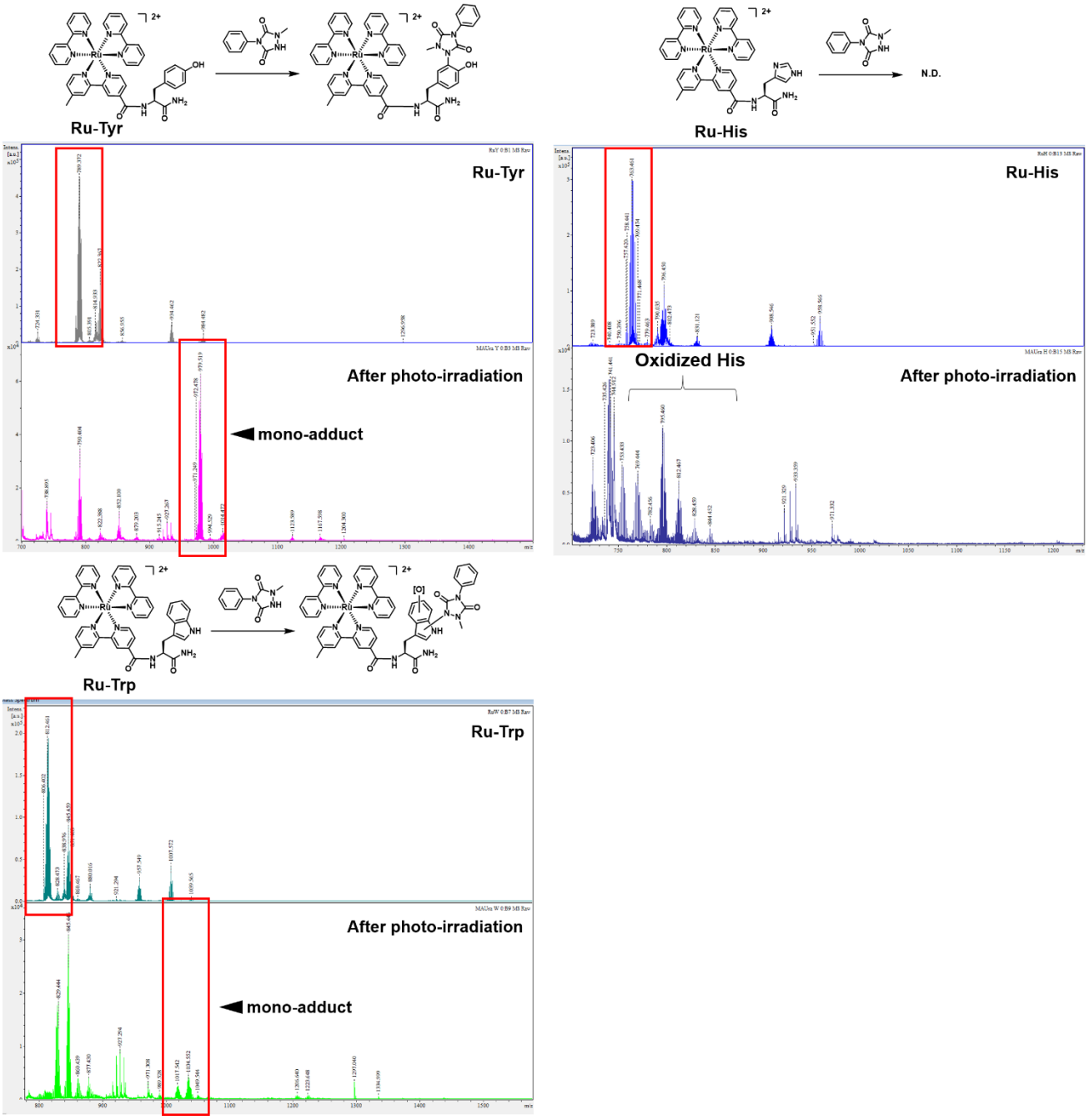


Figure 4-19. MAUra による Ru 光触媒連結型アミノ酸残基（Ru-Tyr、Ru-Trp、Ru-His）のラベル化

4-9-3. 内在性ラクトース結合タンパク質のラベル化・2D-DIGE による解析

前節まででビーズ **45** 上での MAUra-DTB によるラベル化、続く nanoLC-MS/MS 解析によって細胞内在性のラクトース結合タンパク質、galectin-1 および galectin-3 をラベル化することに成功した。本ラベル化反応は、アジド含有 MAUra につづく SPAAC 反応によってラベル化することで、種々の機能団をリガンド結合タンパク質に導入可能であるという利点がある。本節ではこの利点を活用し、ラクトース結合タンパク質の 2D-DIGE による解析を行うこととした。Ru 光触媒担持アフィニティービーズ **45** を用いて、A431 細胞破砕液中で MAUra **22** を用いて光反応を行う。一方のサンプルは光反応を行った後に DBCO-Cy5、もう一方のサンプルには過剰量のラクトースを添加し、ラクトース結合タンパク質をビーズ上から解離させた後に光反応を行い DBCO-Cy3 を用いてクリック反応を行う。その後、2 種のサンプルを混合し、同一ゲル上で二次元電気泳動を行い Cy3、Cy5 のそれぞれの蛍光を検出することにより、非特異的なラベル化によるスポットは Cy3 と Cy5 の両方の蛍光が検出され、リガンド結合タンパク質へのラベル化では Cy3 の蛍光は検出されず Cy5 のみ検出される（Figure 4-20）。Cy5 および Cy3 の蛍光を検出し重ね合わせたところ 30 kDa 付近に 1 種類、15 kDa 付近に pI 3 付近のものと pI 5 付近の 2 種類、合計 3 種類 Cy5 のみの蛍光スポットが検出された。ガレクチン-1 は pI 5.3、ガレクチン-3 は pI 8.5 であることから 30 kDa 付近のスポットは galectin-3、15 kDa かつ pI 5 付近のスポットが galectin-1 である。また pI 3 付近のスポットは nanoLC-MS/MS で同定されてきたタンパク質のいずれにも該当しなかった。そこで該当するタンパク質のゲル内トリプシン消化および MS/MS による解析を試みたが、同定することはできなかった。ラベル化や酸化によって MS による検出が困難となっているものと考察している。また、前節では galectin-3 との相互作用タンパク質もラベル化を受けていることが明らかとなっている。しかし、2D-DIGE による解析では galectin-1 および galectin-3 は検出できているものの他の PPI パートナーは検出することができていない。前述の通り、PPI パートナーは触媒からある程度距離が離れてしまうためリガンド結合タンパク質と比較してラベル化効率が低下してしまう。そのため 2D-DIGE ではリガンド結合タンパク質の検出にとどまっている。しかし、本手法を用いればリガンド結合タンパク質の存在量を定量的に比較することが可能である。すなわち、本手法によって MS での解析のみにとらわれず、リガンド結合タンパク質を解析・同定することが可能となった。

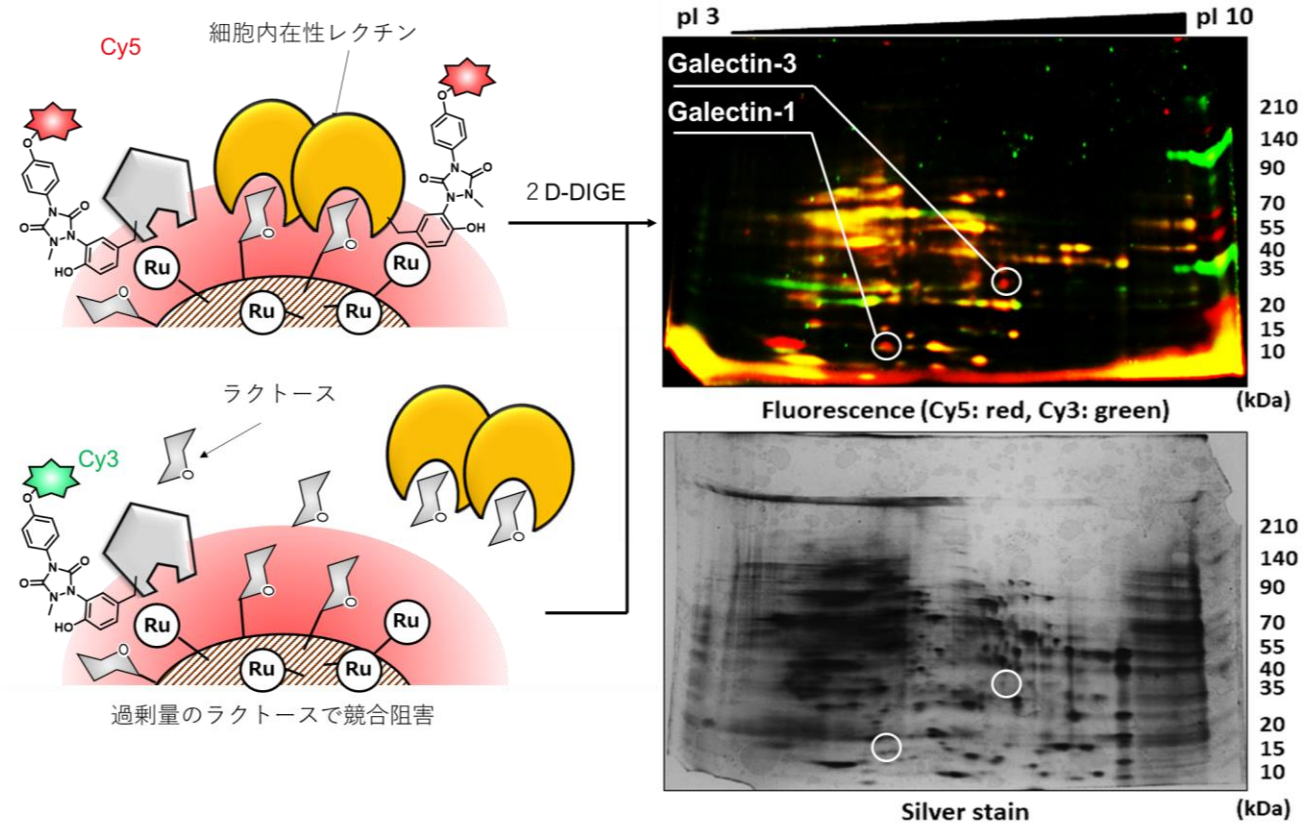


Figure 4-20. ビーズ **45** 上でラベル化されたタンパク質の 2D-DIGE による解析

4-10. 第四章のまとめ

本章では、第二章で開発した Ru/dcbpy 光触媒担持アフィニティービーズおよび第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を駆使し、リガンドとの相互作用が弱いタンパク質であるレクチンのラベル化・同定を行った。ビーズに担持した糖鎖リガンドは、オリゴマーであるレクチンの複数のリガンド結合ポケットを通じて多価に結合するため、強い相互作用でレクチンを捕捉することが可能であることが予測されたが、実際に本手法によって、一般的なレクチンのラベル化法である光親和性標識法（効率<10%）を上回る効率（22%）でリガンドと相互作用するレクチンを高い選択性でラベル化することに成功した。従来法では検出が困難である細胞内在性レクチンのラベル化を行い、ラベル化タンパク質の nanoLC-MS/MS による解析を行ったところ、細胞に内在する複数のリガンド結合タンパク質を網羅的にラベル化することに成功した。ラクトースをリガンドとしたビーズ上でのラベル化によって細胞内在性の微量のラクトース結合タンパク質である galectin-1 および galectin-3 がラベル化されていることが明らかとなった。さらに、2D-DIGE で検出ができるほどのラベル化効率ではなかったものの、ラクトース結合タンパク質のみならず、galectin-3 との PPI パートナーをラベル化することに成功した。従って、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で MAUra を用いたラベル化を駆使することによって、従来法では検出が困難な弱いリガンド-タンパク質相互作用や、タンパク質-タンパク質相互作用をラベル化し同定できることを示した。

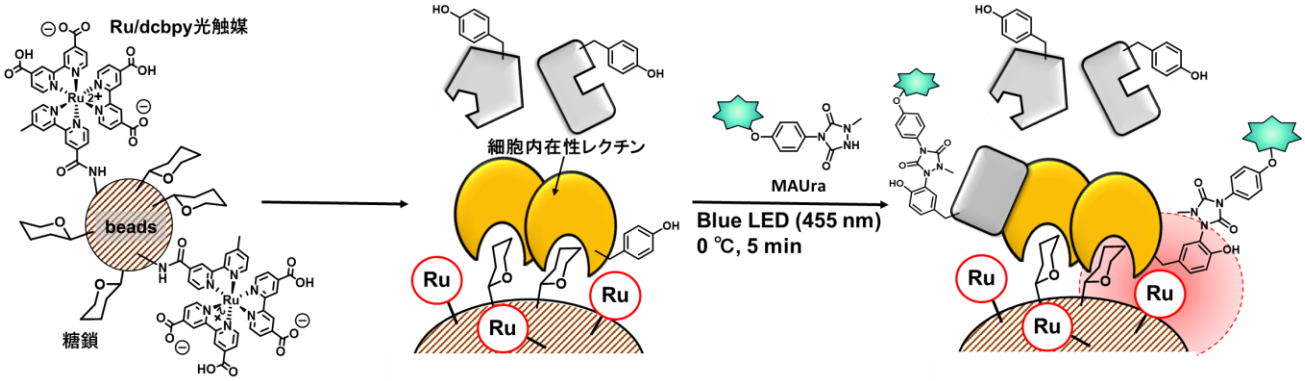


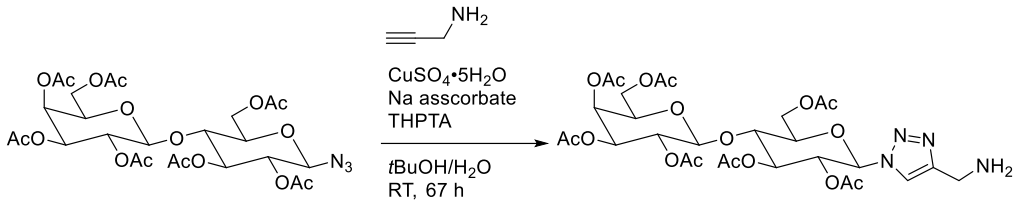
Figure 4-21. 第四章のまとめ

4-11. Reference

1. (a) L. L. Kiessling, J. C. Grim, *Chem. Soc. Rev.* **2013,** *42,* 4476–4491. (b) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998,** *98,* 637–674. (c) J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nat. Chem. Biol.* **2006,** *2,* 238–248. (d) T. Rungrotmongkol, P. Yotmanee, N. Nunthaboot, S. Hannongbua, *Curr Pharm Des* **2011,** *17,* 1720–1739.
2. S. Cecioni, A. Imberty and S. Vidal, *Chem. Rev*., **2015,** *115,* 525–561.
3. (a) K. G. Rice, O. A. Weisz, T. Barthel, R. T. Lee and Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.,* **1990,** *265,* 18429–18434. (b) G. Lauc, R. T. Lee, J. Dumić and Y. C. Lee, *Glycobiology,* **2000,** *10,* 357–364. (c) M. R. Lee, D. W. Jung, D. Williams and I. Shin, *Org. Lett.,* **2005,** *7,* 5477–5480. (d) L. Ballell, M. Van Scherpenzeel, K. Buchalova, R. M. J. Liskamp and R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.,* **2006,** *4,* 4387–4394. (e) K. Sakurai, Y. Hatai and A. Okada, *Chem. Sci.,* **2016,** *7,* 702–706. (f) A. Wibowo, E. C. Peters, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2014,** *136,* 9528 – 9531.
4. (a) M. Hashimoto and Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.,* **2008,** 2513–2523. (b) K. Sakurai, *Asian J. Org. Chem*., **2015,** *4,* 116–126.
5. K. J. Neurohr, D. R. Bundle, N. M. Young, H. H. Mantsch, *Eur. J. Biochem.* **1982,** *123,* 305.
6. Zhang, H.; Laaf, D.; Elling, L.; Pieters, RJ., *Bioconjugate Chem*. **2018,** *29,* 1266−1275.
7. (a) 對馬理彦 「平成二十九年度 修士論文」(b) 中根啓太「令和元年度 修士論文」
8. M. C. Miller, I. V. Nesmelova, D. Platt, A. Klyosov and K. H. Mayo, *Biochem. J.,* **2009,** *421,* 211–221.
9. J. Seetharaman, A. Kfanigsberg, R. Slaaby, H. Leffler, S. H. Barondes and J. M. Rini, *J. Biol. Chem.,* **1998,** *273,* 13047–13052.
10. (a)Thijssen, V. L.; Heusschen, R.; Caers, J.; Griffioen, A. W., *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2015,** *1855,* 235. (b) R. J. Pieters., *ChemBioChem* **2006,** *7,* 721.
11. E. H. Yang, J. Rode, M. A. Howlader, M. Eckermann, J. T. Santos, D. Hernandez Armada, R. Zheng, C. Zou and C. W. Cairo, *PLoS One*, **2017,** *12*, 1–17. (b) S. Jaiswal and K. K. Srivastava, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2018,** *498,* 884–890. (c) K. Fritsch, M. Mernberger, A. Nist, T. Stiewe, A. Brehm and R. Jacob, *BMC Cancer*, **2016,** *16,* 1–10.

Experimental section

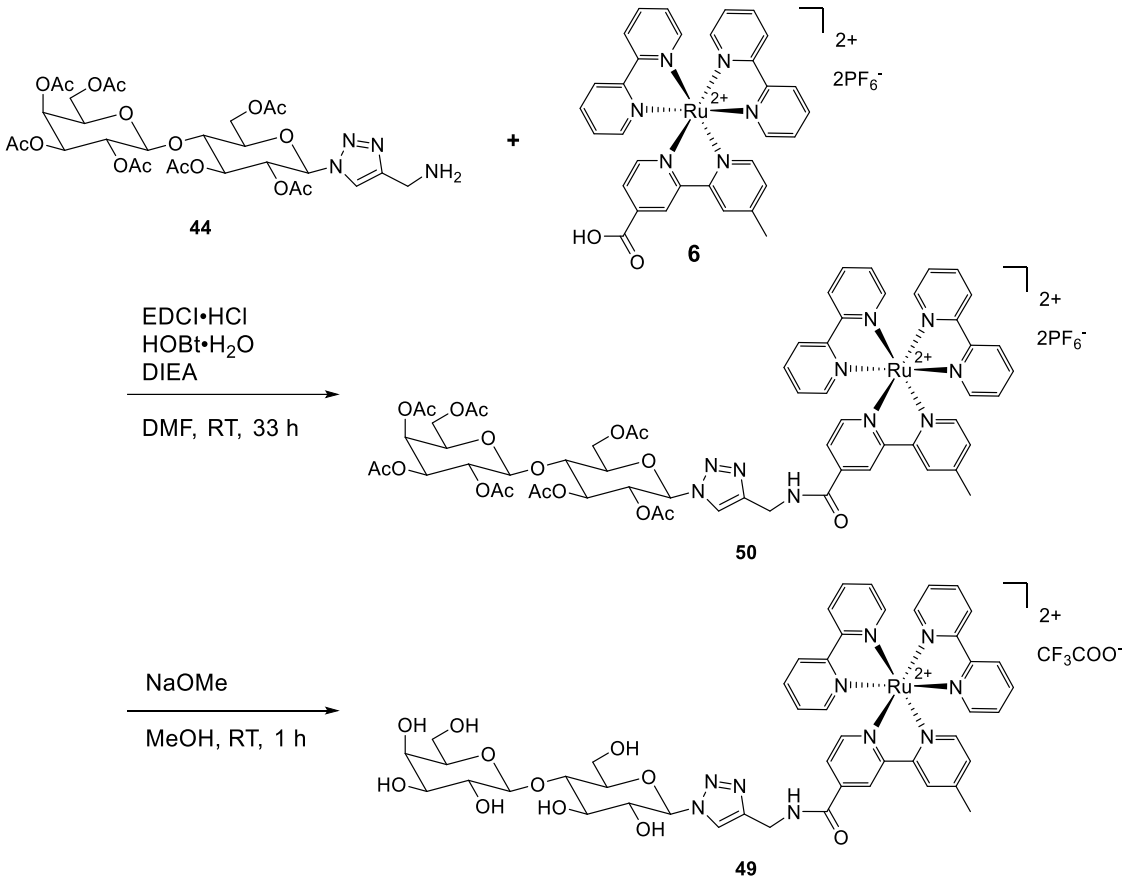
1. Synthesis of compounds. Compound **43** and 2-aminoethylglucose (component of beads **47**) were synthesized according to previously reported procedure.



43 **44**

2. Synthesis of compound 44. To a solution of **43** (203.1 mg, 0.307 mmol) and THPTA (26.0 mg, 0.0599 mmol) in 2.5 mL of *t*BuOH was added aqueous $CuSO_4$ solution (65.0 mM, 1.25 mL, 0.0812 mmol) and aqueous sodium ascorbate (78.3 mM, 1.25 mL, 0.0980 mmol) at room temperature under Ar atmosphere. After stirring at room temperature for 67 h, the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2, the organic layer was washed with saturated aqueous NaCl solution, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue was purified with silica gel chromatography with CH_2Cl_2:MeOH=10:1 to give **44** as amorphous (48.0 mg, 0.067 mmol, 23% yield) .

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66 (s, 1H), 5.83-5.81 (m, 1H), 5.41-5.39 (m, 2H), 5.37 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.16-5.12 (m, 1H), 4.99-4.97 (m, 1H), 4.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.18-4.08 (m, 4H), 3.98-3.89 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.88 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 169.6, 169.3, 169.2, 119.3, 101.2, 85.6, 76.0, 75.7, 72.7, 71.0, 70.9, 70.6, 69.1, 66.7, 61.8, 60.9, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.4; FT-IR (neat) 3382, 3142, 2919, 2851, 1738, 1651, 1557, 1433, 1368, 1213, 1041 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{29}H_{41}N_4O_{17}$ $[M+H]^+$: 717.2461, found 717.2460.



3. Synthesis of lactose conjugated Ru photocatalyst 49. To a solution of **6** (10.0 mg, 10.9 μmol) in 1.0 mL of DMF was added EDCI・HCl (2.3 mg, 12.0 μmol), HOBt・H_2O (1.6 mg, 18.0 μmol), **44** (8.6 mg, 12.0 μmol) and 10 μL of DIEA at room temperature. After stirring for 33 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residues were purified by reverse-phase column chromatography (10-100% MeCN/H_2O) and HPLC (40-100% MeOH/0.1%TFA aq.) to obtain the semi-pure product **50** as orange oil. **50** was dissolved in 2.0 mL of methanol and 100 μL of NaOMe (28% MeOH solution) and stirred at room temperature for 1 h. The reaction was quenched by addition of 1.0 mL of 4 M HCl solution in dioxane and concentrated *in vacuo*. The residues were purified by reverse-phase column chromatography (0-100% MeCN/H_2O) and HPLC (10-100% MeOH/0.1%TFA aq.) to obtain **49** as red amorphous (1.9 mg, 12%).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 9.08 (s, 1H), 8.71 (d, J = 7.0 Hz, 4H), 8.66 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.18-8.10 (m, 4H), 7.96 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.85-7.80 (m, 4H), 7.64 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.52-7.47 (m, 4H), 7.38 (d, J = 5.0 Hz), 5.64 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.73(s, 2H), 4.41(d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.97-3.50 (m, 21H), 2.61(s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 158.6, 153.4, 152.7, 151.8, 139.4, 130.2, 129.0, 126.9, 126.2, 125.7, 125.6, 123.7, 123.0, 105.1, 89.3, 79.7, 79.5, 77.2, 76.8, 74.8, 73.7, 72.5, 70.3, 69.0, 62.6, 61.5, 61.3, 60.9, 36.3, 30.8, 21.8; FT-IR (neat) 3353, 3123, 3054, 2941, 2854, 1681, 1611, 1541, 1444, 1372, 1266, 1137 cm^{-1}; HRMS (ESI, positive): *m/z* calced. for $C_{47}H_{50}N_{10}O_{11}Ru$ $[M]^{2+}$: 516.1353, found 516.1356.

4. Preparation of NHS ester-functionalized affinity beads. The 4.0 mg of Dynabeads (Dynabeads® MyOne™ carboxylic acid, 400-800 nmol mg^{-1} carboxylate, Invitrogen)[8] was washed with DMF and dissolved in 800 μL of 200 mM NHS/DMF solution. Then, the mixture was added EDCI・HCl (final concentration ; 200 mM), stirred for 2 h at room temperature and the beads was washed with DMF to give NHS ester functionalized Dynabeads. The NHS ester-functionalized affinity beads applied to section 5 (For storing the beads, stored in isopropyl alcohol at -20 °C).

5. Preparation of ruthenium photocatalyst- and lactose-functionalized affinity beads. 0.5 mg of NHS ester-functionalized affinity beads (prepared according to section 4) was washed three times with 100 μL of DMF. To the beads in DMF was added Ru/dcbpy complex **13** (from 10 mM stock solution in DMF, final concentration 0.1 mM), **44** (from 10 mM stock solution in DMF, final concentration 0.1 mM) and Et_3N (from 100 mM stock solution in DMF, final concentration 1 mM) (final concentration of beads: 5.0 mg/mL). After stirring for 1 h at room temperature, the supernatant was collected by magnetic separation. The amount of Ru/dcbpy complex and **44** immobilized on beads was determined by LC-MS analysis of this supernatant (**44**: 3.8 nmol/mg beads, Ru/dcbpy complex: 19.8 nmol/mg beads, see Figure 4-4). Then, to the beads was added 1 M 4-amino-1-butanol solution in DMF and stirred at room temperature for capping of unreacted NHS ester. The supernatant was removed by using magnetic separation, the beads was washed with water three times. To the beads was added aqueous 0.1 M NaOH solution for the purpose of deprotecting *O*-acetyl group in lactose structure and stirred at room temperature for 1 h. The resulted beads were washed with 10 mM MES buffer (pH 7.4) and applied to section 7, 8, 9 and 10 (For storing the beads, stored in aqueous 50% MeOH solution at -20 °C).

6. Preparation of crude cellular extract. HeLa cells or A431 cells (2.0×10^7 cell) were washed with phosphate buffered saline (PBS) three times and EDTA solution was added. After incubation for 5 min at 37 °C, the suspension was added to PBS and supernatant were removed after centrifugation (1500 rpm, r.t., 3 min). The cells were washed with PBS three times and 1.0 mL of Lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 v/v% Triton X) was added. After incubation on the ice for 15 min, the sample was vortexed for 10 s and centrifuged (13200 rpm, 4 °C, 7 min) to give supernatant as HeLa or A431 cell lysate. The concentration of cell lysate was determined by protein BCA assay.

7. Target protein-selective labelling in cell lysate. MAUra-N_3 (**22**, from 100 mM solution in DMSO, final concentration 500 μM) and beads **45** (concentration of beads: 5.0 mg/mL) were added to the protein solution (PNA (Wako, 1 μM) containing HeLa cell lysate (1.0 mg/mL proteins) 50 μL or A431 cell lysate (3.0 mg/mL proteins) 50 μL), and the mixture was incubated at 4 °C for 4 h. The light irradiation (RELYON, Twin LED light, 455 nm, 230 mW/cm^2) was performed on ice, 0.5 cm from the light source for 5 min. The reaction mixture was added to 2-iodoacetamide (from 100 mM solution in H_2O, final concentration 2 mM), incubated at 37 °C for 30 min. Then, to the reaction mixture, D-(+)-lactose (from 100 mM solution in H_2O, final concentration 10 mM) was added. After shaking the tube for 1 h at room temperature, the beads were removed by magnetic separation, low MW molecules was removed by gel filtration (GE Healthcare, Sephadex™ G-25 Medium), the

filtrate was added DBCO-Cy3 (Aldrich) (from 10 mM solution in DMF, final concentration 50 μM) or DBCO-Cy5 (Aldrich) (from 10 mM solution in DMF, final concentration 50 μM) and incubated for 1 h at 37 °C (When performing 2D-DIGE analysis, refer to section 8 for subsequent operations.). The resulted samples were added 5×SDS-PAGE sample buffer (final concentration: 50 mM Tris–HCl pH 6.8, 125 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol) and heated 95 °C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE using 4-20% acrylamide gels (Biorad). Fluorescence of labelled proteins was detected with a Molecular Imager Fusion Solo S (VILBER LOURMAT). After obtaining of fluorescent image, the same gel was visualized with Coomassie brilliant blue (CBB) stain, and the image was obtained with a Molecular Imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

8. Two-dimension electrophoresis analysis of fluorescent-labelled lactose-binding protein. Lactose-binding proteins were labelled in A431 cell lysate (3.0 mg/mL proteins) with Cy3 or Cy5 according to protocol of section 8. Low MW molecules were removed with ReadyPrep™ 2-D cleanup kit (BioRad). The rehydration of IPG strips (Immobiline DryStrip, pH 3−10, 7 cm, Bio Rad) were performed for 12 h in rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2%(w/v) Bio-Lyte® 3/10 ampholyte, trace of BPB) containing the probe-labelled protein (mixed with Cy3-labelled proteins and Cy5 labelled proteins). Isoelectric focusing was carried out using the Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). The IPG strips were incubated for 15 min in equilibration buffer I (0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS, 6 M urea, 20% glycerol and 2% (w/v) DTT) followed by equilibration buffer II (0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS, 6 M urea, 20% glycerol and 2.5% (w/v) iodoacetamide) for 15 min. The strips were then transferred to 4-20% polyacrylamide gradient gel and electrophoresis was performed. Fluorescence image was obtained with a Fusion Solo 4S (Vilber Lourmat). The gel was visualized with coomassie brilliant blue (CBB) stain or silver stain and obtained image with a Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio Rad).

9. Enrichment of desthiobiotin-labelled proteins. MAUra-DTB (**41**, 100 mM stock solution in DMSO, final concentration 500 μM) and beads **45** (final beads concentration: 5.0 mg/mL) were added to 1 μM PNA solution (50 μL x 15 vials, in MES buffer pH 7.4) or A431 cell lysate (3.0 mg/mL), and the mixture was incubated at 4 °C for 4 h. The light irradiation was operated according to section 7, and proteins were precipitated by 2D clean up kit (BioRad). The residue was rehydrated with lysis buffer, Dynabeads™MyOne™Streptavidin C1 (Invitrogen) (0.5 mg) was added and shaken at room temperature for 60 min. The beads were washed with lysis buffer three times. For the elution of desthiobiotin labelled proteins, beads were added DTB elution buffer (2 mM biotin, 200 mM DTT, 1 x NuPAGE buffer (Thermo)) (50 μL) and incubated at 95 °C for 5 min. Then, the supernatant was collected by magnetic separation and applied to section 10 or 15.

10. Western-blotting analysis of labelled galectin-1 and galectin-3. Desthiobiotin labelled proteins in A431 cell lysate were enriched according to section 9. The protein mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked with Immuno Block (DS Pharma), treated with anti-galectin-1 (rabbit, abcam) or anti-galectin-3 (rabbit, abcam) and anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology), a blot was treated with ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and chemical luminescence was detected with a Molecular Imager Fusion Solo S (VILBER LOURMAT).

11. In-gel tryptic digestion. Separated proteins by SDS-PAGE were cut out (ca. 1 mm pieces) and gel pieces were transferred into tube. Then, to remove low MW molecules, the gel pieces were incubated with 1 mL of water at 37 °C for 10 min and supernatant was removed (Repeat 3 times). The gel pieces were added Silver Stain KANTO Gel Washing Solution For MS and de-stained gel pieces were washed by water. Gel pieces were dehydrated by addition of MeCN. After removal of the supernatant, the gel pieces were added 100 mM DTT in 100 mM aqueous NH_4HCO_3 solution, the tubes were incubated at 37 °C for 30 min. After removal of the supernatant, the gel pieces were added 250 mM 2-iodoacetamide in 100 mM aqueous NH_4HCO_3 solution for carbamide methylation of cysteine residue, incubated at room temperature for 30 min in the dark. After the carbamide methylation, the gel pieces were washed with 100 mM aqueous NH_4HCO_3 solution and 50% MeCN in 100 mM aqueous NH_4HCO_3 solution and dehydrated by addition of MeCN. The dehydrated gels were added trypsin solution and incubated at 37 °C overnight. Resulted solution was quenched by aqueous TFA solution (final conc. 0.1%) and desalted using C18 pipette tips (Nikkyo Technos Co., Ltd.). Desalted solution was applied to LC-MS analysis.

12. LC-MS analysis of labelled peptide fragments. PNA-labelling was operated using **22** (500 μM) and $Ru(bpy)_3Cl_2$ (1 mM for 5 μM PNA monomer) or beads **45** (5.0 mg/mL for 1 μM PNA monomer), and DBCO-Cy3 according to section 2-11. After trypsin digestion, the peptides were detected by LC-MS detecting the fluorescence of Cy3 (ex. 550 nm, em. 570 nm). The micropump gradient method was used, as follows. Mobile phase A: 0.1% FA, mobile phase B: 100% acetonitrile. 0−5 min: 5% B, 5−40 min: 5−60% B, 40−45 min: 60−100% B, 45−51 min: 100% B, 51−53 min: 100−5% B, 53−60 min: 5% B.

13. Galectin-3 inhibitory assay. To the 96 well microplate (F-bottom, black, high binding, Greiner) was added ASF solution (20 μg/mL, final: 1 μg/well) and incubated at 4 °C overnight. Then, unoccupied binding sites were blocked by Immunoblock (DS pharma) at room temperature for 1 h. Recombinant galectin-3 conjugated His-tag (abcam) was pre-incubated with lactose or beads at room temperature for 30 min. Concentrations of lactose on beads **45** were normalized by calculation from lactose molecules immobilized on beads **45** (3.8 nmol/mg beads). After washing operation of the plate with TTBS, to the ASF-immobilized plate was added pre-incubated galectin-3 solution (1 μM, 50 μL) and the plate was incubated at 37 °C for 1 h. After washing operation, to the well was added anti-His-tag mAb-Alexa Fluor® 488 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) and the inhibitory activity was quantified by detecting fluorescence (ex. 485 nm, em. 535 nm) with plate reader (TECAN, infinite F200).

14. Affinity purification of lactose-binding proteins using lactose-functionalized affinity beads. Lactose-functionalized beads was prepared according to section 5. To the 0.25 mg beads functionalized with lactose was added 50 μL of A431 cell lysate (3.0 mg/mL proteins). After incubation for 4 h at 4 °C, the supernatant was removed by magnetic separation and the beads was washed by lysis buffer three times. Then, to the beads was added 1×SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 125 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol). The samples were heated at 95 °C for 5 min and the beads was removed by magnetic separation. The proteins were separated by SDS-PAGE with 4-20% acrylamide gradient gels (Bio Rad), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked with Immuno Block (DS Pharma), treated with anti-galectin-1 (rabbit, abcam) or anti-galectin-3 (rabbit, abcam) and anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology), a blot was treated with ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and chemical luminescence was detected with a Molecular Imager Fusion Solo S (VILBER LOURMAT).

15. Preparation of digested peptides for nano LC-MS/MS analysis. Desthiobiotin labelled proteins were enriched according to section 9. Low MW molecules were removed with ReadyPrep™ 2-D cleanup kit (BioRad). Resulted proteins (25-50 μg) were denatured by addition of 14.25 μL of 8 M urea solution. To the solution was added DTT (from a 100 mM solution in 100 mM NH_4HCO_3, final 5 mM) and incubated at 37 °C for 30 min. Then, to the solution was added 2-iodoacetamide (from 220 mM solution in 100 mM NH_4HCO_3, final 55 mM) and incubated at 37 °C for 30 min. Resulted solution was diluted by addition of 60 μL of 100 mM NH_4HCO_3. Trypsin solution (final 10 ng/μL) was added to the solution, and pH was adjusted by addition of 10% TFA solution (pH≒8). After incubation at 37 °C for 1 h, to the solution was added 10 μL of 100 mM NH_4HCO_3 and trypsin solution (final 20 ng/μL). The solution was incubated overnight, and quenched by aqueous TFA solution (final conc. 0.1%) and desalted using C18 pipette tips (Nikkyo Technos Co., Ltd.). Desalted solution was applied to LC-MS/MS analysis (section 16).

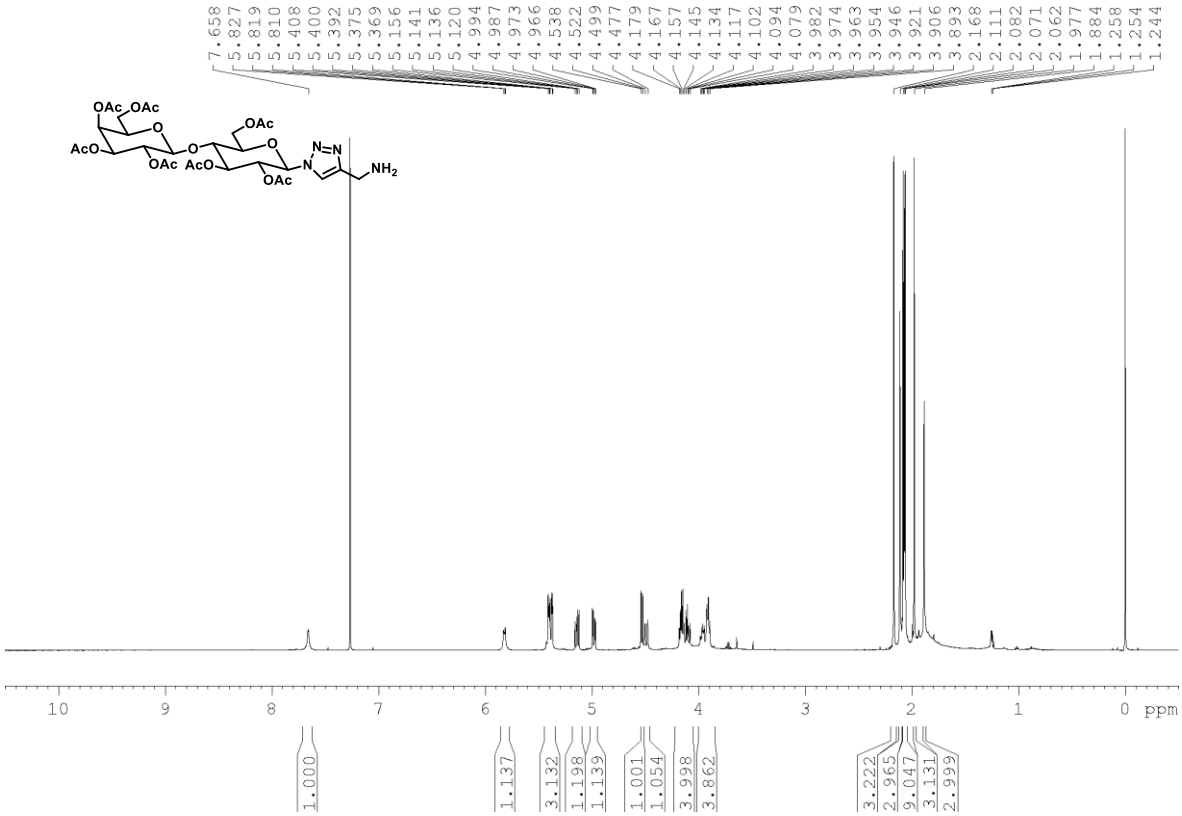
16. Nano LC-MS/MS analysis. LC-MS/MS analysis was performed by LC-nano-ESI-MS composed of a quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometer (Q-Exactive; Thermo Fisher Scientific) equipped with a nanospray ion source and a nano HPLC system (Easy-nLC 1000; Thermo Fisher Scientific). The trap column used for the nano HPLC was a 2 cm × 75 μm capillary column packed with 3 μm C18-silica particles (Thermo Fisher Scientific) and the separation column was a 12.5 cm × 75 μm capillary column packed with 3μm C18-silica particles (Nikkyo Technos Co., Ltd.). The flow rate of the nano HPLC was 300 nL/min. The separation was conducted using a 10−40% linear acetonitrile gradient at 70 min in the presence of 0.1% formic acid. The LC-MS/MS data were acquired in data-dependent acquisition mode controlled by Xcalibur 4.0 (Thermo Fisher Scientific). The settings of data-dependent acquisition were as follows: the resolution was 70,000 for a full MS scan and 17,500 for MS2 scan; the AGC target was 3.0E6 for a full MS scan and 5.0E5 for MS2 scan; the maximum IT was 60 ms for both a full MS scan and MS2 scan; the scan range was 310−1,500 m/z for a full MS scan and 200−2,000 m/z for MS2 scan; and the top 10 signals were selected for MS2 scan per one full MS

scan. The MS/MS spectra were searched against the UniProt database of human (taxonomy 9606; downloaded on Feb. 29, 2016) using the Sequest algorithm within the Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

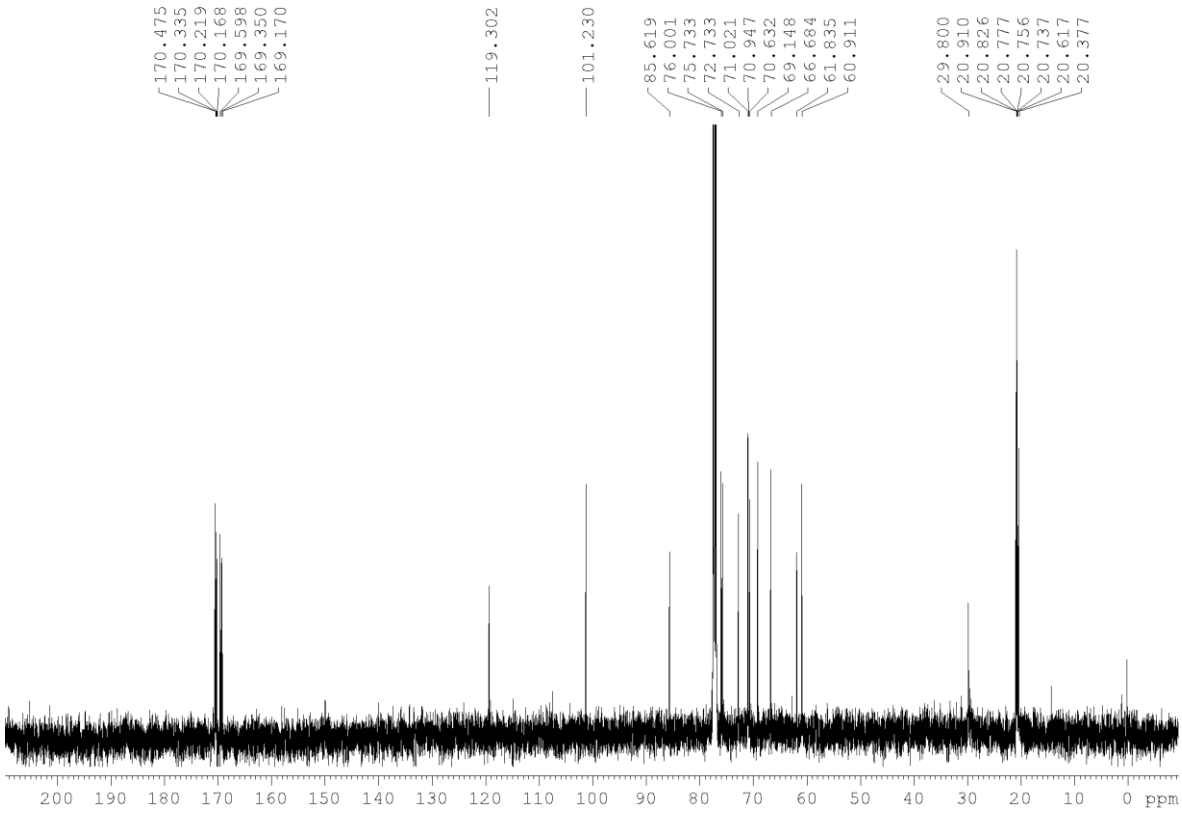
^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds

Compound 44

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

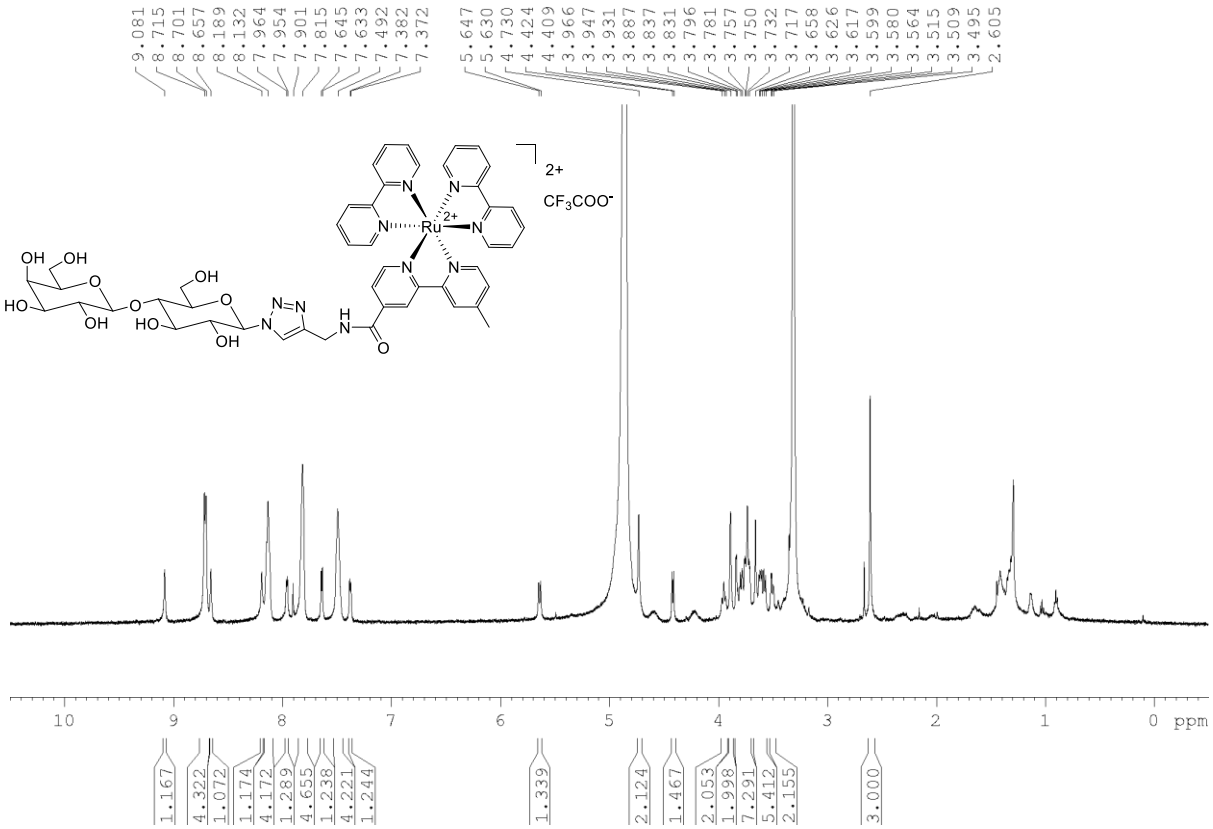


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

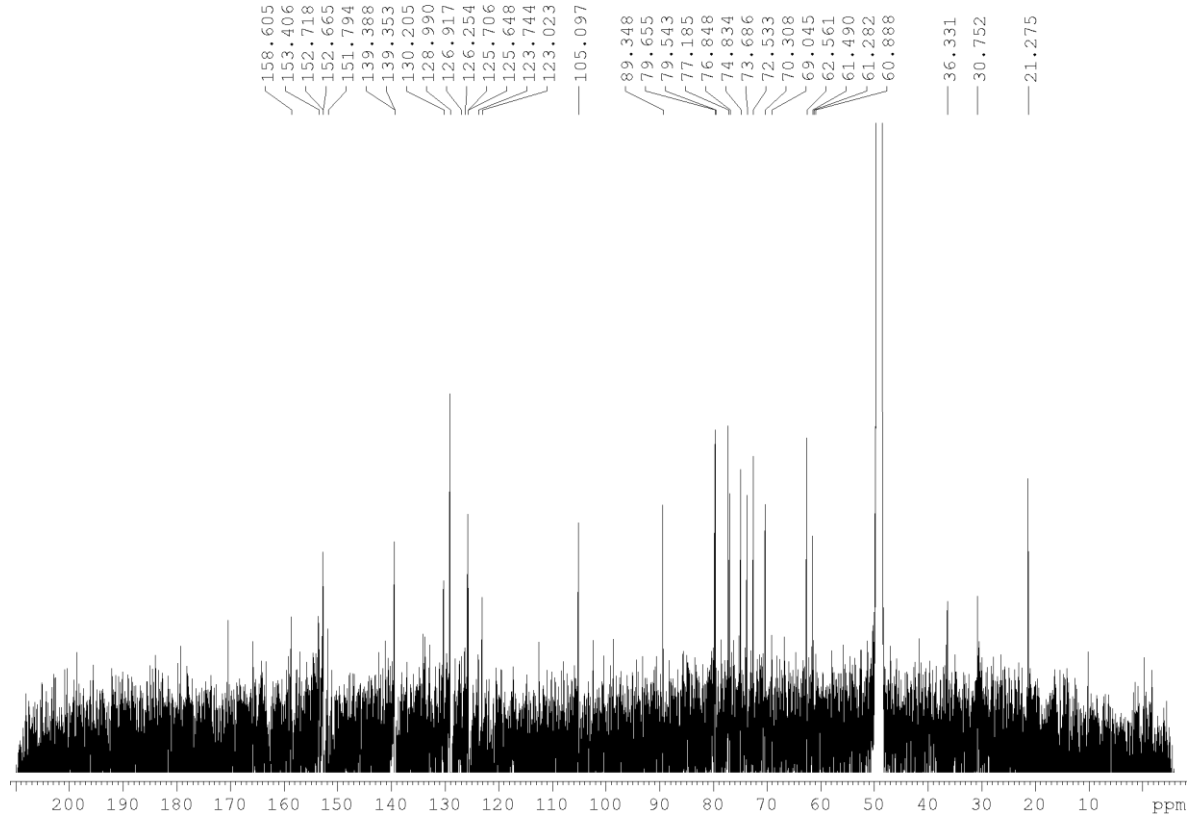


Compound 49

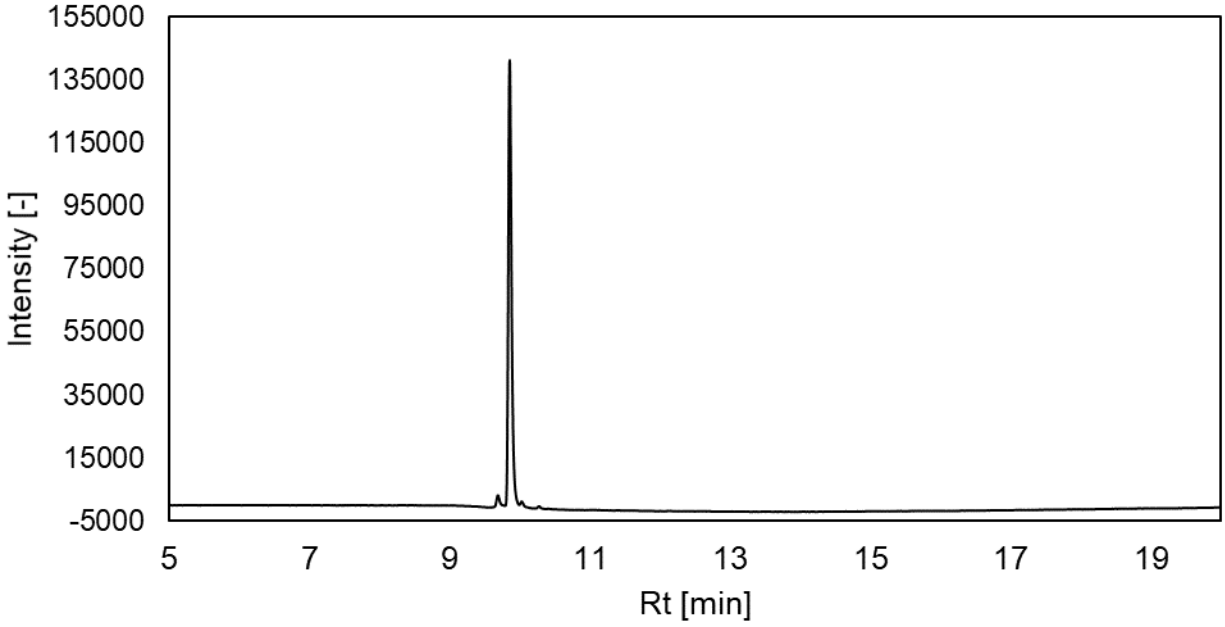
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)



^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)



HPLC analysis of compound 49



Analysis conditions:

Absorbance 455 nm

Column: InertSustainSwift™ C18 4.6 x 250 mm (GL Science Inc.)

Mobile phase A: 0.1% FA in H_2O, mobile phase B: 0.1% FA in acetonitrile. 0−5 min: 5% B, 5−17 min: 5−100% B, 17−22 min: 100% B, 22−23 min: 100−5% B, 23−25 min: 5% B.

第五章

生細胞内での光触媒近接ラベル化を活用した

タンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発

5-1. はじめに

前章までは Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で、近接ラベル化剤 MAUra を用いたラベル化を行い、従来法では検出が困難な親和性の弱いリガンド–タンパク質相互作用を同定する手法を開発した。その検討の中で、本ラジカル的ラベル化反応は触媒と最も近接した環境にあるリガンド結合タンパク質のみならず、離れた位置に存在するタンパク質–タンパク質相互作用（PPI）パートナーもラベル化できることが明らかとなった。しかしながら前章までは細胞破砕液中でのラベル化を検討していたため、生細胞内でのタンパク質の局在や時間依存的に変化する動的な PPI を捉えることは困難である。序論でも述べた通り、生細胞内での動的な PPI 解析のために BioID 法や APEX 法といった触媒近接ラベル化法が用いられる。しかしながら、これらの方法は 10 ~ 20 nm のラベル化半径を有しているため、巨大なタンパク質複合体の解析や、タンパク質の局在を解析では有用な手法であるものの、複数のタンパク質がラベル化半径内の存在できるため、解析対象タンパク質（protein of interest: POI）の近くに存在しているものの直接相互作用していないタンパク質もラベル化されうる。すなわち POI と直接相互作用するタンパク質の同定には適していない。もし、MAUra のもつナノメートルオーダーのラベル化を細胞内での PPI 解析に応用することができれば POI との直接の相互作用タンパク質を選択的にラベル化し、解析することが可能になると期待した。そこで本章では近接ラベル化剤 MAUra を用い、POI の相互作用タンパク質の選択的なラベル化を志向した、細胞内光触媒近接ラベル化法（intracellular photocatalytic-proximity labeling: iPPL）の確立を目指した。

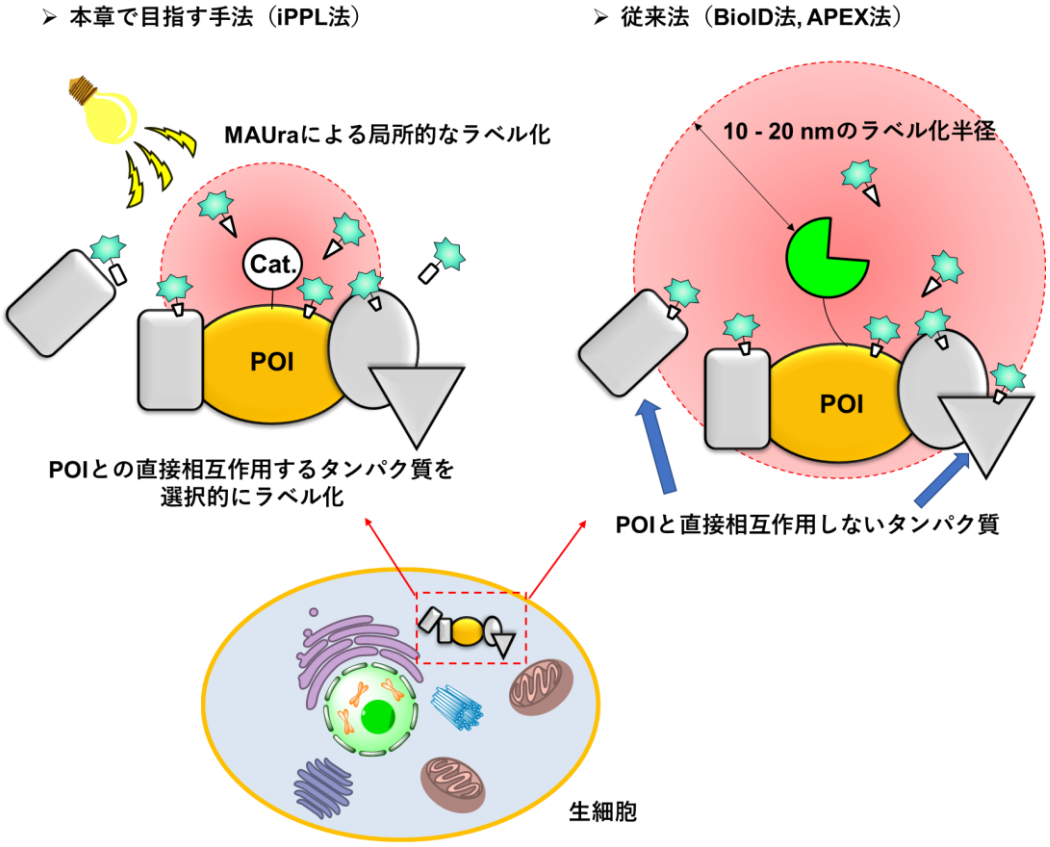


Figure 5-1. 本章のコンセプト

5-2. 細胞内でのタンパク質相互作用ラベル化戦略

本章の目的は、POI に相互作用するタンパク質の同定であり、それを達成するためには、POI に対して光触媒を連結させる必要がある。三章・四章で述べたリガンド連結型光触媒を用いるアプローチでは、リガンド分子はそのタンパク質の阻害剤であることがほとんどであるため、タンパク質の機能や PPI に影響を与える懸念がある。そこで、POI の N 末端もしくは C 末端にタンパク質の機能への影響が少ない低分子構造の捕捉タグを導入することとした。これにより、タグ付けした POI を遺伝子工学的に導入する必要があるが、タンパク質の機能の変化や PPI の変化を抑えつつ、光触媒を連結できる。具体的な捕捉タグとして haloalkane dehalogenase の変異体である HaloTag（ca. 33 kDa）を用いることとした [1]。HaloTag はクロロヘキシル構造をリガンドとし、結合ポケット内のアスパラギン酸がクロロヘキシル構造に対して求核攻撃することにより共有結合で触媒構造を導入できる。HaloTag-POI を遺伝子工学的に細胞に発現させ、HaloTag リガンド連結型光触媒を細胞外から加えることで、POI に対して特異的に触媒構造を連結する（Figure 5-2）。

また、前章までは Ru 光触媒を用い、細胞破砕液中でリガンド結合タンパク質のラベル化を行ってきた。細胞内環境でラベル化を行うためには、ラベル化能力のみならず細胞膜透過性も重要なファクターとなる。Ru 光触媒は正電荷を持つ比較的サイズの大きい触媒であるため、より小さな有機化合物と比較して細胞膜透過性が低いことが予想される。したがって、ラベル化効率が高く細胞膜透過性に優れた光触媒を選定する必要がある。そこで本章では、細胞内での触媒近接ラベル化に最適な有機光触媒を選定することとした。選定された有機光触媒に対して HaloTag リガンド構造を連結し、iPPL 法のコンセプト証明を行うこととした。

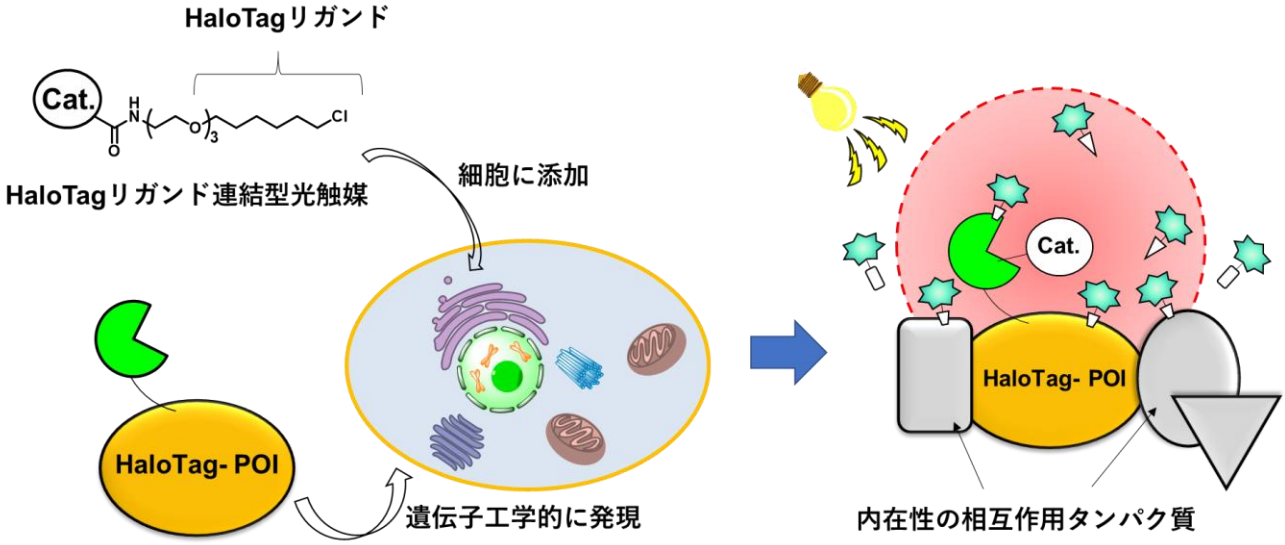


Figure 5-2. 細胞内での相互作用タンパク質ラベル化方法

5-3. 細胞内でのタンパク質ラベル化に最適な有機光触媒のスクリーニング

前節で述べたように、細胞内でのタンパク質ラベル化においては膜透過性の高い有機光触媒を見出す必要がある。バイオイメージングで用いられるアクリジン骨格、BODIPY、クマリン、フルオレセインやローダミンといった蛍光プローブは一電子移動反応を進行させる有機光触媒としてしばしば用いられる[2]。このような生体適合性の高い蛍光プローブの中からラベル化触媒となりうる化合物を選定することとした。また、ラベル化能の評価だけでなく、POI に近接するタンパク質のみをラベル化できる近接ラベル化能も評価することとした。すなわち、タンパク質ラベル化能を有していたとしても、タンパク質吸着性の高い触媒構造であれば POI と関連の無いタンパク質への吸着を引き起こし、非特異的なラベル化反応へとつながることが予想される。この近接ラベル化能を評価する方法として、前章までで用いた光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質ラベル化が有効である。本手法であれば光触媒候補化合物を担持したアフィニティービーズ上でのラベル化能、pull down アッセイによる触媒に対するタンパク質吸着性の双方を評価可能である。

市販で入手可能な NHS エステルを有するラベル化触媒候補化合物（**51-68**）と CA リガンドの NHS エステル誘導体 **69** をアミンで表面修飾された磁気ビーズ上に担持した。また、未反応のアミンが残存している場合はタンパク質の非特異的な吸着を起こすため、過剰量の無水酢酸によって未反応のアミンの保護を行い、光触媒候補化合物（**51-68**）を担持したアフィニティービーズを作製した（Figure 5-3）。

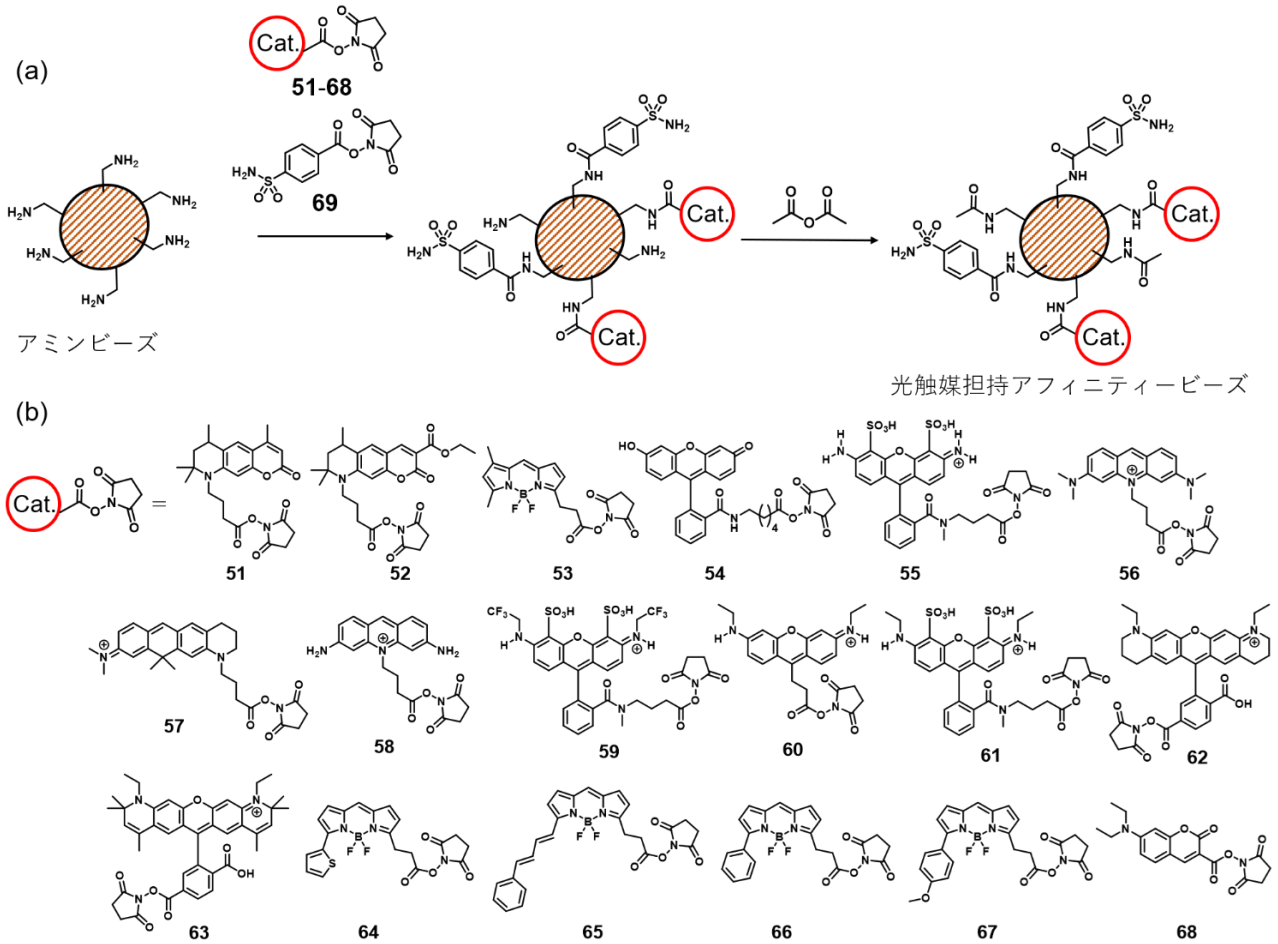


Figure 5-3. (a) アミンビーズに対する光触媒・リガンド担持方法 (b) 担持した候補化合物の構造

調製したビーズを第三章と同様に CA を添加した細胞破砕液中に加えた。次いで MAUra-N_3 を添加し光照射を行い、DBCO-Cy3 との SPAAC 反応によってラベル化タンパク質上のアジド基に対して蛍光団 Cy3 を導入しラベル化反応を可視化した（Figure 5-4a）。また、前章まで用いてきた Ru/dcbpy 光触媒 **13** とラベル化効率や選択性を比較するため、ビーズの調製方法は異なるが、NHS ビーズから調製した Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズも同様にラベル化の評価を行った。クマリン（**52, 68**）や BODIPY（**53, 64-67**）、フルオレセイン **54**、アクリジン（**56, 58**）やローダミン（**62, 63**）といった複数の候補化合物がタンパク質ラベル化触媒となることがわかった（Figure 5-4b）。いずれの光触媒も Ru 光触媒 **13** と比較してラベル化効率は低い。一般的に有機金属触媒は配位子によって中心金属が保護されるため、反応系中の化学種や溶媒による触媒の失活が起こりにくいため触媒回転数が高い。一方で、有機光触媒は励起された触媒が溶媒中で保護を受けない剥き出しの状態となり、反応系中の化学種や溶媒により容易に失活するため触媒回転数が低い。このため、有機金属触媒である Ru 光触媒が最も高い効率でラベル化できたと考えている。有機光触媒の中で、効率よくラベル化反応が進行している **52-54, 56, 58, 62-68** について、ラベル化選択性に着目すると、クマリン **68** や BODIPY **53**、ローダミン **62, 63** は、Ru/dcbpy 光触媒 **13** と同様の高い選択性で CA をラベル化できた。**52** や **54** については CA が主にラベル化されているもののリガンド非依存的なラベル化反応が検出された。アクリジン骨格を有する acriflavine **58** や acridine orange **56** はリガンド非依存的なラベル化反応が主に進行していることが明らかとなった。

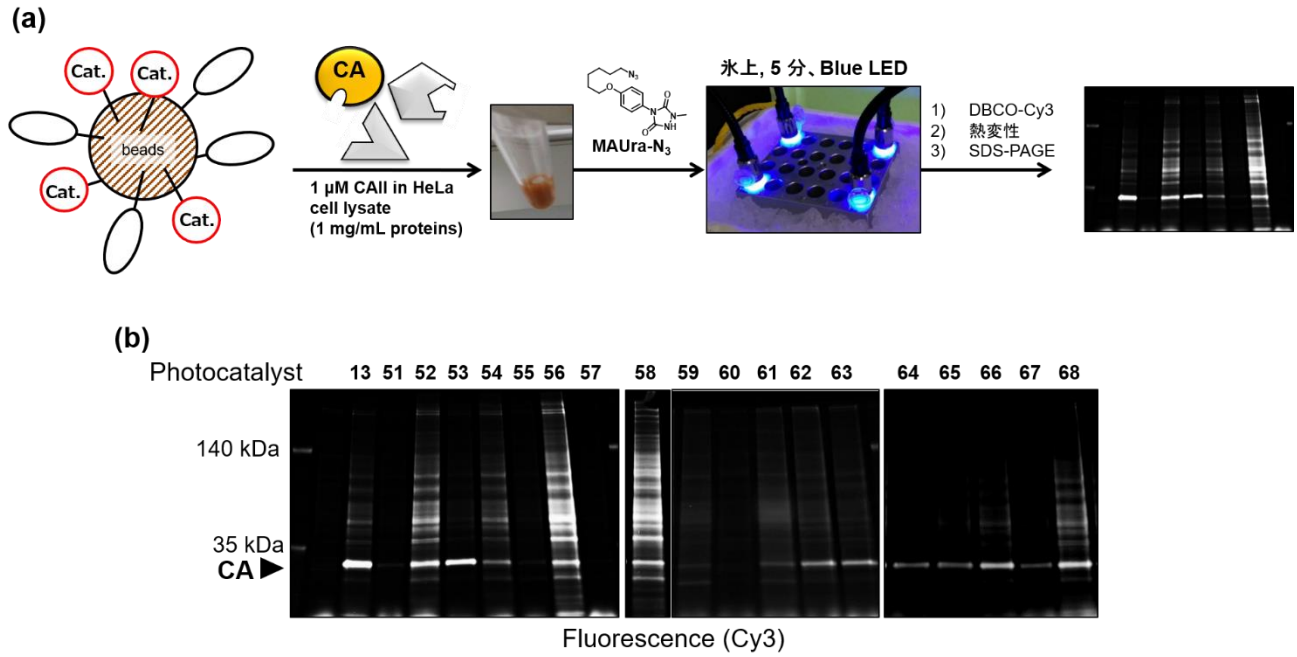


Figure 5-4. 触媒近接ラベル化に適した光触媒のスクリーニング (a) 評価方法 (b) 光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質ラベル化結果

上記で見出した光触媒について、疎水性や電荷に由来する触媒に対するタンパク質吸着性を評価することとした。作製した光触媒担持アフィニティービーズを用いてリガンド結合タンパク質である CA の精製を検討した（Figure 5-5a）。タンパク質吸着性の低い光触媒では CA を選択的に得られるが、タンパク質吸着性の高い光触媒では CA 以外にも多くのタンパク質が得られる。光触媒 **51-68** のうちラベル化能を有している有機光触媒についてその吸着性を評価した。高い選択性で CA をラベル化できたクマリン **68** や BODIPY **53, 64-67**、ローダミン **62, 63** は高い選択性で CA を精製することができた（Figure 5-5b）。触媒の疎水性による吸着性の影響を評価するために、同一の BODIPY 骨格をもち、側鎖の構造が異なる誘導体 **53, 64-67** について吸着性を比較した。**53** に対して芳香環やオレフィンが導入されて疎水性が向上した場合に、CA 以外のタンパク質も検出されているが、選択性を大きく損なうほどの吸着量ではなく、タンパク質の吸着性に対する疎水性の影響は顕著なものではないことが示唆された。実際にこれらの BODIPY 誘導体はラベル化の効率に差はあるもののいずれも CA を選択的にラベル化することができている。同様にローダミン **63** も CA 以外のタンパク質を吸着しているが、ラベル化選択性は CA を選択的に精製可能な **62** と同様である。すなわち、リガンド結合タンパク質が主に得られるような、わずかなタンパク質吸着性の違いであればラベル化の選択性に影響を与えないことが示唆される。一方でリガンド非依存的なラベル化が進行した acriflavine **58** や acridine orange **56** を担持したビーズは CA を選択的に得ることができず、顕著にタンパク質を吸着することが明らかとなった。これらのアクリジン骨格は正電荷を有しているため、タンパク質のアニオン性のアミノ酸残基（グルタミン酸、アスパラギン酸）と静電的な相互作用をし、タンパク質の吸着を引き起こしていると予想できる。電荷に着目した場合、**62** や **63** も正電荷を有しているが、カルボン酸も有しているため、分子内で正電荷を中和することができる。これは第二章で述べた Ru/dcbpy 光触媒においてタンパク質吸着性が抑えられる原理と同様である。

以上からクマリン、BODIPY、ローダミンは低いタンパク質吸着性に由来する標的選択性の高いラベル化反応が進行すること、アクリジン骨格を有する化合物は正電荷に由来するタンパク質吸着性によってリガンド非依存的なラベル化が進行することが明らかとなった。これらのうち、細胞膜透過性を考慮し、サイズの小さな有機光触媒を以降の検討で用いる光触媒として選定することとした。具体的には、タンパク質吸着性の低い触媒として BODIPY **53**、クマリン **68** を選定し、タンパク質吸着性の高い触媒として acriflavine **56** を選定した。これら 3 つの触媒に加えて、最もラベル化効率の高い光触媒である Ru 光触媒を加えた計 4 つの光触媒を以降の検討で用いることとした。

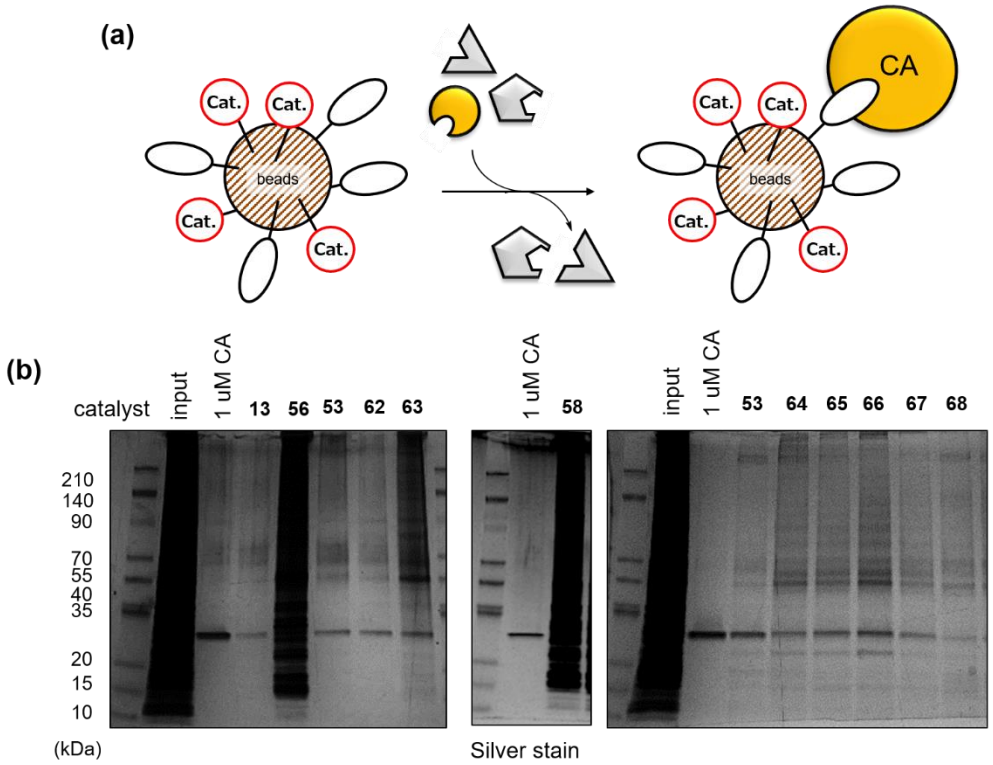


Figure 5-5. 光触媒担持アフィニティービーズを用いた CA の精製 (a) 評価系の模式図 (b) 各光触媒担持アフィニティービーズによる CA 精製結果 (Input: 1 μM CA in HeLa cell lysate (3.0 mg/mL proteins))

5-4. 細胞膜上での光触媒近接ラベル化の検討

前節まででタンパク質吸着性が低くリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化できる有機光触媒として BODIPY、クマリンを、タンパク質吸着性が高いことからリガンド非依存的にラベル化が進行する有機光触媒 acriflavin を見出した。これらの有機光触媒および $Ru(bpy)_3$ 触媒に HaloTag リガンドを連結し、生細胞における光触媒近接ラベル化を検討することとした。細胞内での検討を行う前に、膜透過性や細胞内の夾雑物の影響を受けない条件で、HaloTag 上に結合した光触媒がラベル化触媒として機能するか評価することとした。膜タンパク質である血小板成長因子受容体（PDGFR）の膜貫通ドメイン（transmembrane domain: TM）を POI として選定した（Figure 5-6a）。HEK293FT 細胞に対して HaloTag-TM（V5-HaloTag-Myc-TM）を発現させ、次いで HaloTag リガンド連結型触媒 **70-73** で処理した。未結合の触媒を PBS で洗浄後、MAUra-DTB を添加し、1 分間の青色光照射を行うことで光触媒近接ラベル化を行った。Ru 光触媒 **70** や BODIPY **72**、クマリン **73** ではいずれもラベル化反応は進行しなかった（Figure 5-6b, lane 1-2, 5-8）。Acriflavin **71** を用いた場合にのみ HaloTag-TM に対してラベル化反応が進行した（lane 3）。さらに、HaloTag-TM が発現している細胞でのみラベル化反応が進行していることから、HaloTag-TM 上の acriflavine **71** によって本ラベル化反応は進行していることが示唆された（lane 3 vs. 4）。

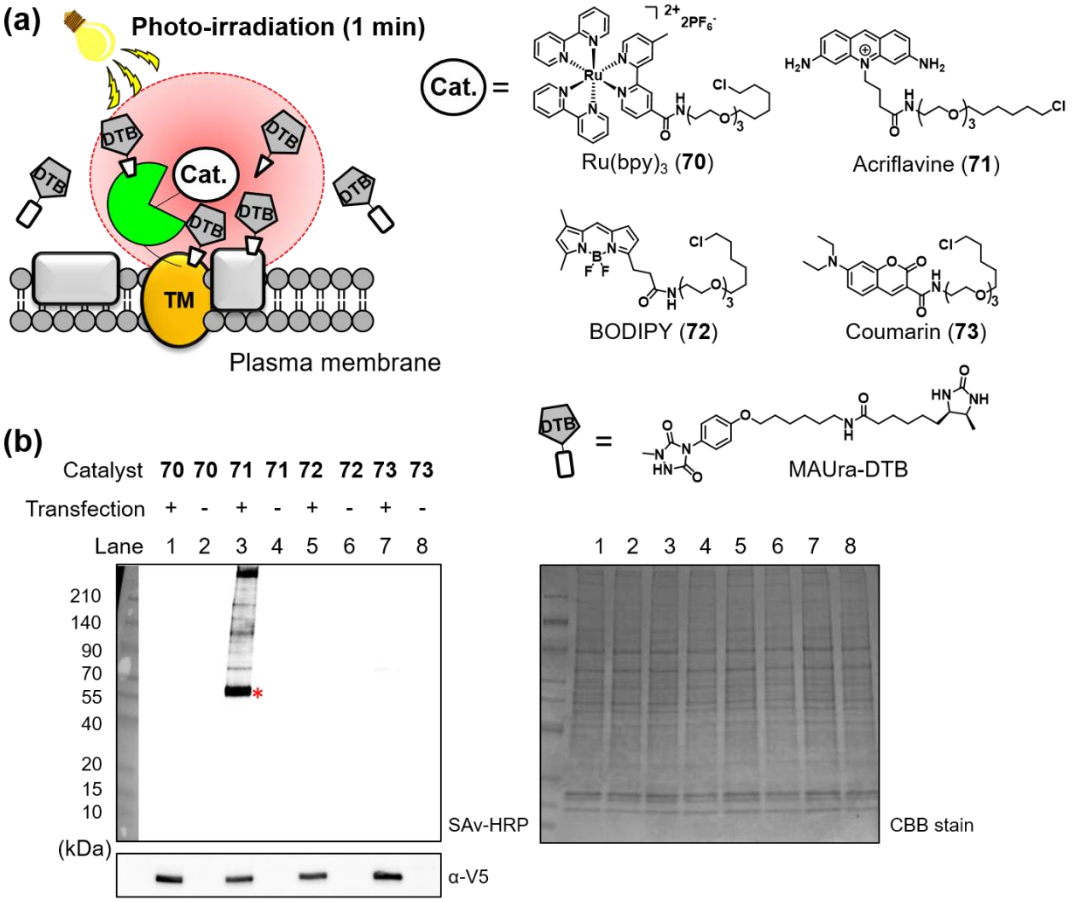


Figure 5-6. 選定した有機光触媒による細胞膜上でのラベル化反応 (a) 用いたリガンド連結型光触媒構造 (b) HaloTag-TM のラベル化

細胞膜上でのラベル化であるため、本ラベル化結果は光触媒の膜透過性の影響はないものとみなせる。細胞破砕液中でのリガンド結合タンパク質ラベル化の検討では、いずれの光触媒もタンパク質ラベル化触媒能を有していることがわかっている（Figure 5-4）。それにもかかわらず HaloTag-TM に対するラベル化能が異なる要因は光触媒のタンパク質吸着性にあるのではないかと考えている。前節の検討で、BODIPY、クマリンはタンパク質吸着性が低く acriflavin はタンパク質吸着性の高い光触媒であることがわかっている。光触媒担持ビーズ上での検討においては、光触媒が細胞破砕液中のあらゆるタンパク質と相互作用ができるため、タンパク質吸着性の高さはラベル化選択性の低下を招いた。しかし、HaloTag と光触媒を共有結合で連結する HaloTag-POI を用いた場合には、触媒は POI 上に局在しており、POI およびその周辺タンパク質のみと相互作用し吸着する。HaloTag は C 末端からリガンド結合ドメイン（D116）までの距離がおよそ 3 nm 程度である（Figure 5-7a）。**71** はリンカー長がおよそ 2 nm であるのに対し、リガンドポケットの深さは 1.7 nm 程度であることから、Acriflavine 骨格はポケットの出口付近に存在していることが予想される。そこで、リガンドポケット出口付近にある F155 と C 末端との距離を見積もったところ、C 末端からおよそ 4.4 nm の距離に Acriflavine が存在することとなる。また MAUra を用いたラジカル的なラベル化反応は触媒からおよそ 1 nm の距離で進行することが第三章で明らかとなっている。すなわち、HaloTag 上の光触媒は POI からラベル化半径の 4 ~ 5 倍程度離れた位置にあるため、POI や相互作用タンパク質をラベル化することは困難である（Figure 5-7b）。一方で acriflavine が HaloTag 上に存在する場合、acriflavine は POI や相互作用タンパク質への吸着することができる。その際にエネルギー的に多少不利なコンフォメーションをとることが予想できるが、触媒に吸着性がない場合と比較して、触媒がタンパク質に接近しやすいものと考えられる。従って HaloTag-POI を用いた近接ラベル化においてはタンパク質吸着性の高い acriflavine が最適な光触媒になる。

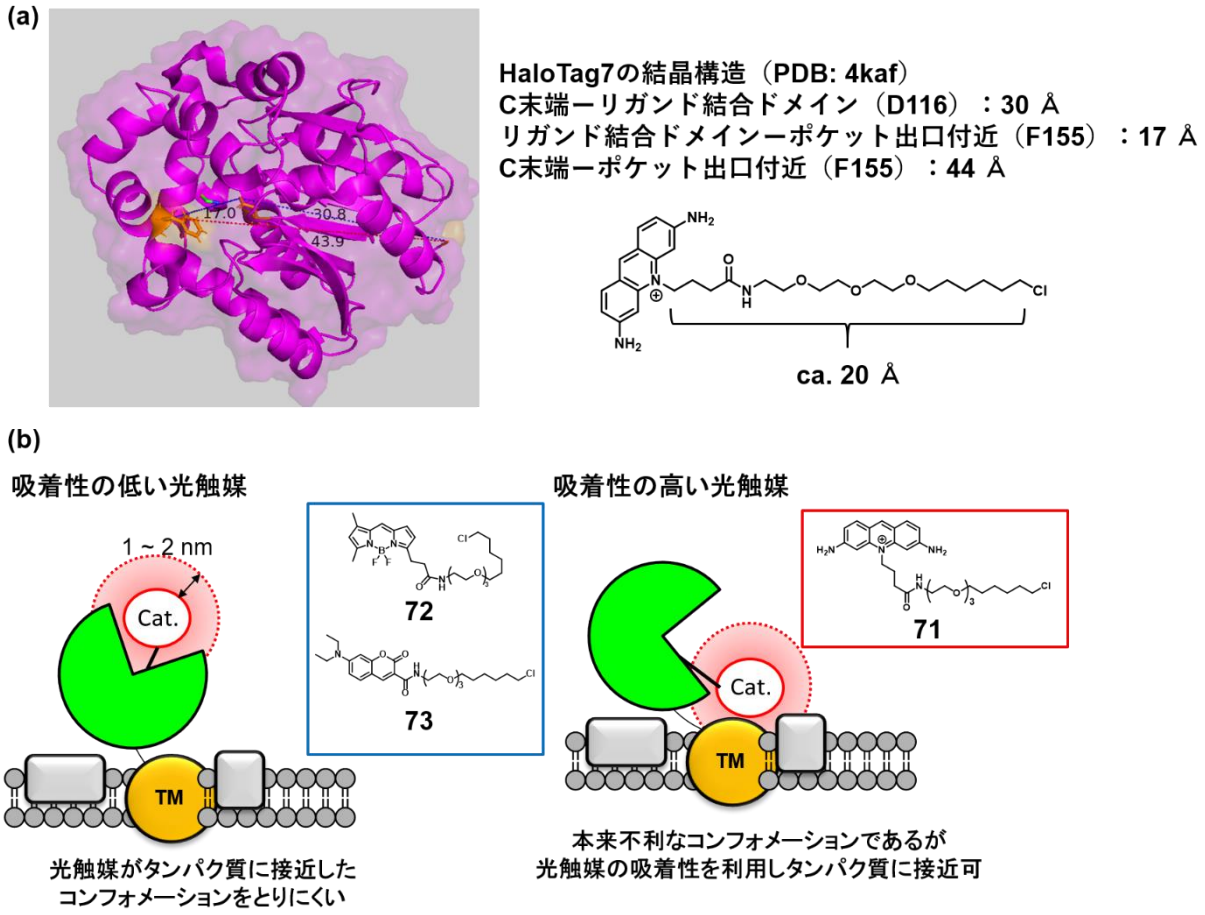


Figure 5-7. POI-光触媒間の距離と光触媒の吸着性、ラベル化との相関 (a) HaloTag7 の結晶構造（PDB: 4kaf）および C 末端からリガンド結合ポケット出口までの距離 (b) 光触媒のタンパク質吸着性と光触媒の配置の相関

5-5. Acriflavine 光触媒のタンパク質ラベル化様式

5-5-1. Acriflavine 光触媒によりラベル化されるアミノ酸残基の同定

前節で HaloTag-POI を用いたラベル化に最適な有機光触媒として acriflavine を見出した。本節では acriflavine 光触媒によりラベル化されるアミノ酸残基を明らかにすることとした。そこで、ペプチドに対してラベル化反応を行い、ラベル化ペプチドの MS/MS 解析を行うことでラベル化残基を明らかにすることとした。1 つのチロシン残基を有するペプチドである Angiotensin II をモデルペプチドとし、10 当量のラベル化剤（1-methyl-4-phenylurazole）と 10 当量の acriflavine 存在下、5 分間の青色光照射を行った。ラベル化反応後、反応溶液の MALDI TOF-MS 解析を行うことでラベル化反応の進行を確認した（Figure 5-8）。

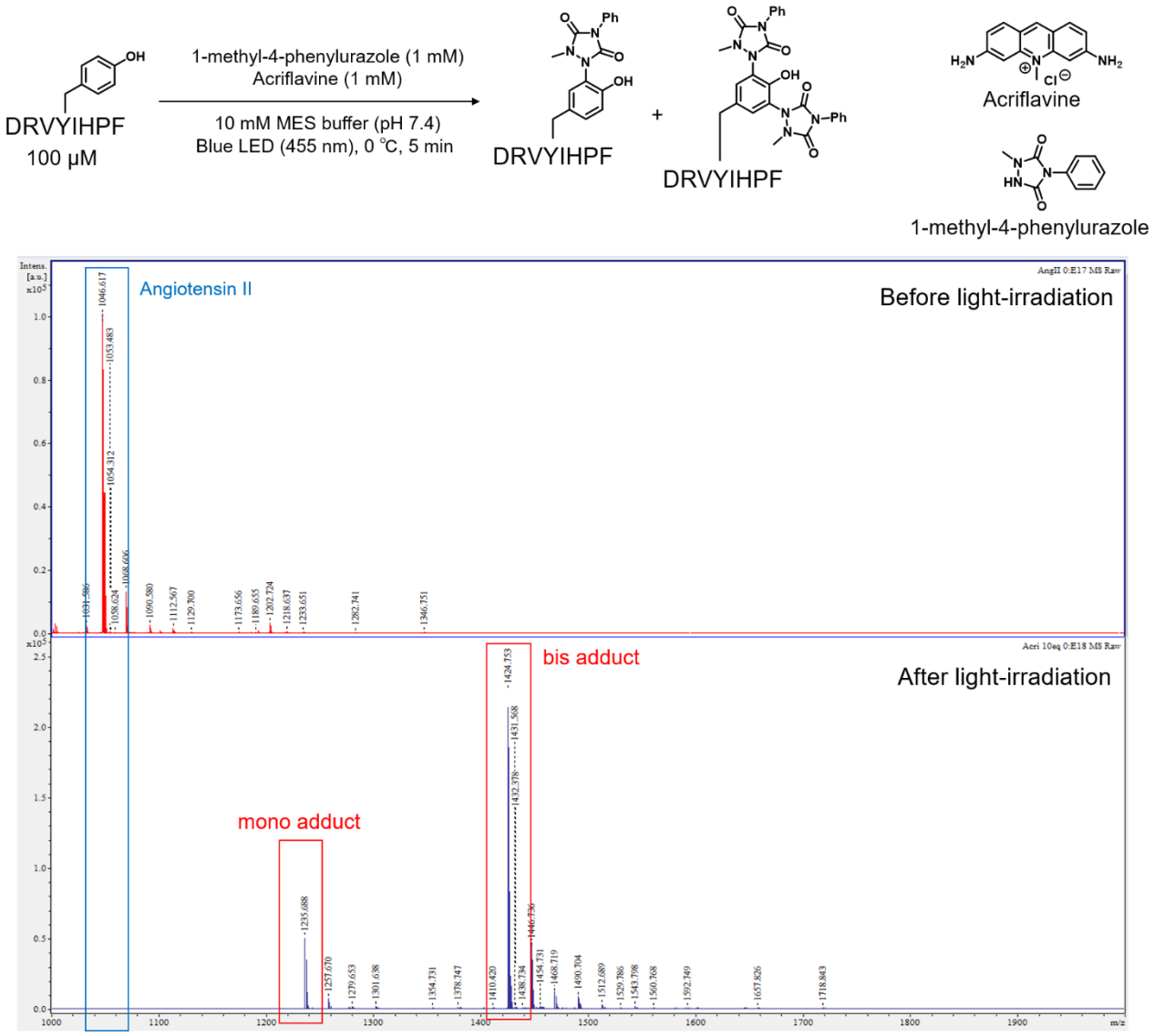


Figure 5-8. Acriflavine 光触媒下、MAUra による Angiotensin II のラベル化検討

5 分間の光照射後、angiotensin II（m/z:1046）はほとんど消費され、angiotensin II のモノラベル化体（m/z: 1215）およびビスラベル化体（m/z: 1424）が得られた。それぞれのラベル化ペプチドについて MS/MS 解析を行ったところ、モノラベル化体とビスラベル化体のいずれもチロシン残基がラベル化を受けていることが明らかとなった（Figure 5-9）。

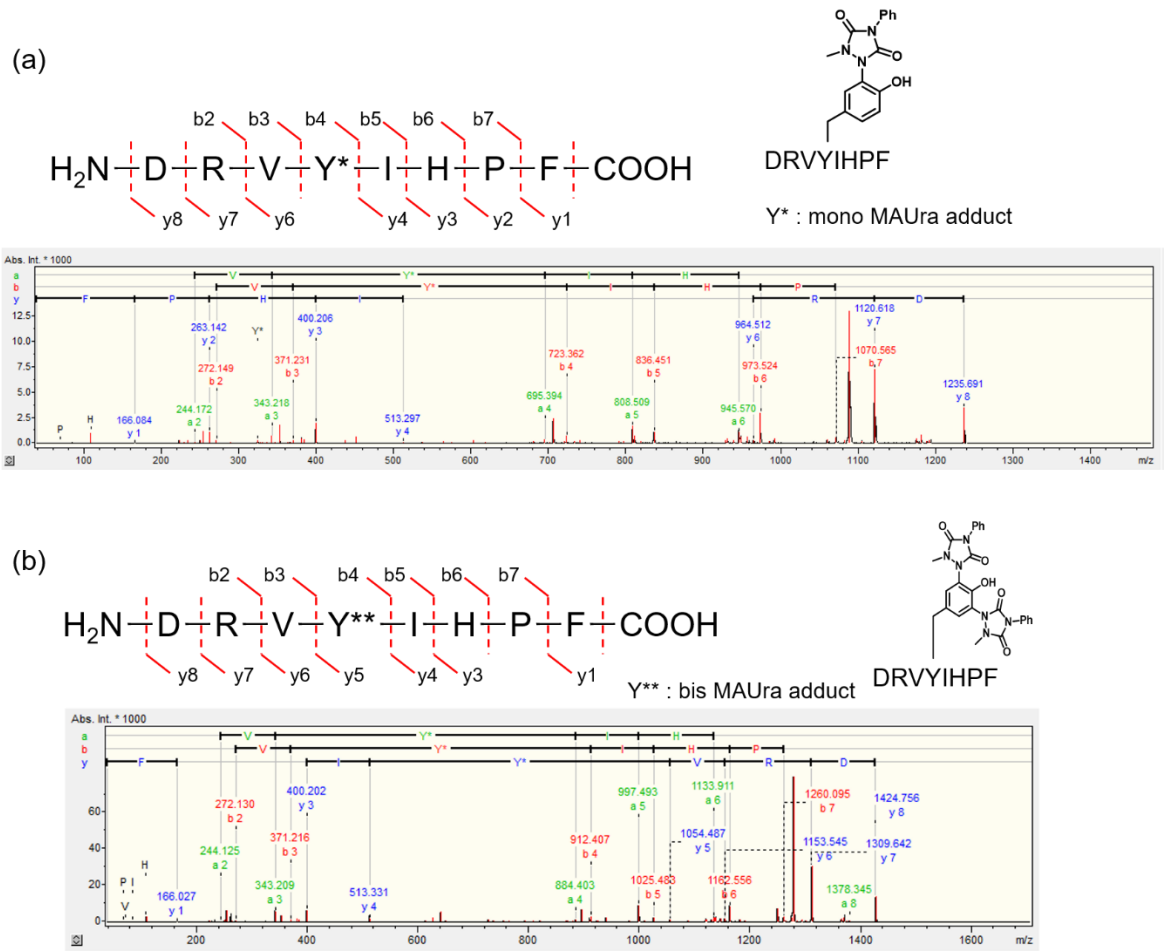


Figure 5-9. ラベル化 angiotensin II の MS/MS 解析 (a) モノラベル化体の MS/MS 解析 (b) ビスラベル化体の MS/MS 解析

またチロシンを含まないペプチドに対しても同様にラベル化反応を検討した。チロシン残基選択的にラベル化反応が進行するのであれば、チロシンを含まないペプチドでは反応が進行しないはずである。実際に、チロシンを含まないペプチドではラベル化反応は進行しなかった（Figure 5-10）。すなわち、acriflavine は Ru 光触媒と同様にチロシン残基を選択的にラベル化できる光触媒であることが明らかとなった。

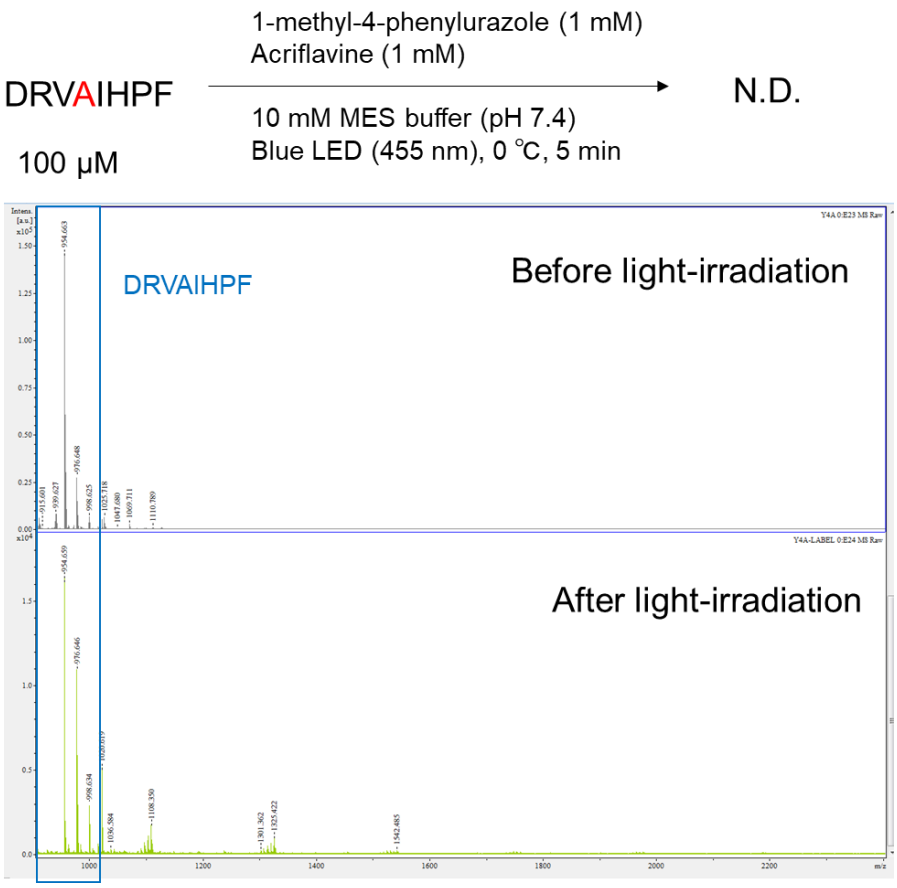


Figure 5-10. チロシンを含まないペプチド（DRVAIHPF）に対するラベル化検討

5-5-2. Acriflavine によるチロシン残基ラベル化の推定反応機構

アクリジン骨格は有機光触媒として有機合成にしばしば用いられ、基底状態および励起状態における酸化還元電位が調べられている。Acriflavine の酸化還元電位は調べられていないが、構造類縁体であるプロフラビンの酸化還元電位が調べられている（Figure 5-11a）。カチオン性の構造を持つことから酸化を受けにくいことが予想されるが、実際に、基底状態においてはプロフラビンの酸化に由来する CV ピークは現れず、還元ピークのみ（$E^{red}_{1/2}$ = -0.72 V vs. SCE）が得られることがわかっている [2]。このことから、基底状態では一電子酸化機構でラジカルを形成することはできず、励起状態がラジカル形成に関与する。プロフラビンにおいては励起状態で E^{red}_{T1} = +1.48 V vs. SCE の電位を持つことから、励起状態においてはチロシン残基（E^{ox} = 0.82 V vs. Ag/AgCl）やラベル化剤 MAUra（E^{ox} = 0.52 V vs. Ag/AgCl）をラジカル化することが可能である。このことから本ラベル化反応の推定反応機構は Figure 5-11b に示すようになる。すなわち、可視光励起された acriflavine が直接チロシン残基や MAUra から一電子移動によってラジカル形成を行う。さらに、この際に生じる acriflavine のラジカルは溶液中の溶存酸素により酸化されるため、acriflavine は触媒的に再度ラベル化反応を進行させることができる。

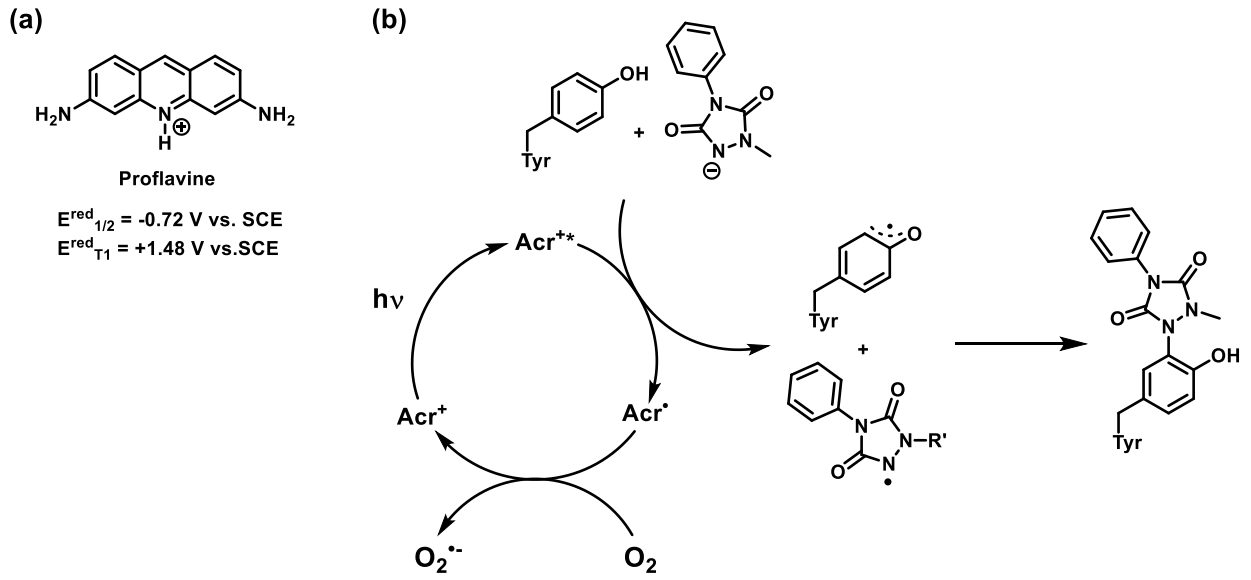


Figure 5-11. (a) Acriflavine の構造類縁体である Proflavine の構造および酸化還元電位 (b) Acriflavine 光触媒によるチロシン残基ラベル化反応の推定反応機構

5-6. 細胞内での光触媒近接ラベル化（iPPL）の検討

前節までの検討で HaloTag-POI を用いた細胞でのラベル化システムに最適な光触媒として acriflavin を見出した。本触媒を用いて iPPL 法を検討することとした。POI には nucleosome を構成するヒストンを選定し、8 量体を構成する 4 種類のモノマー（H2A、H2B、H3、H4）のうち H2B に対して HaloTag を融合させ、acriflavine 光触媒を連結することにした。ヒストンで起こる PPI は共免疫沈降法や BioID 法、タンパク質クロスリンクで調べられている [3]。しかし核内タンパク質の可溶化にはタンパク質の変性条件を必要とすることが多く、免疫沈降法では一部の PPI が変性により失活することが懸念されている。そのため、核内の PPI 解析は生細胞内の非変性条件で、近接ラベル化を用いた解析が望ましい。しかしながら、nucleosome はヒストンに巻きつく DNA 構造を含めても直径 10 nm 程度の複合体である。このような比較的小さなタンパク質複合体に対して BioID 法を適用する場合、5-1 節で述べたようにヒストンに関連しないタンパク質がラベル化を受ける懸念があり、よりラベル化半径の小さな近接ラベル化手法が望まれる。そこで本節では約 10 nm のタンパク質複合体である nucleosome に対して、近接ラベル化剤 MAUra を用いた局所的なラベル化を行い、iPPL 法のコンセプト証明を行った。

5-6-1. HaloTag-H2B を発現させた細胞内での acriflavine の局在

iPPL 法を行う前に、acriflavine 光触媒が細胞内に取り込まれて POI と結合するか調べることとした。HaloTag-H2B を HEK293FT に強制発現させ、コラーゲンコートを行ったカバーガラス上で培養し、acriflavin **71** で 2 時間処理した。4%パラホルムアルデヒド水溶液で固定化したのちに核の染色試薬 Hoechst で 15 分間処理し、PBS で未結合の色素を 1 回洗浄した。Hoechst および acriflavine の蛍光を共焦点顕微鏡によって観測し、acriflavine が核に局在しているか確認した。acriflavin **71** は核の染色試薬である Hoechst と局在が一致していることが明らかとなった。すなわち、強制発現させた HaloTag-H2B および光触媒である acriflavine はそのほとんどが核に局在していることがわかった（Figure 5-12）。

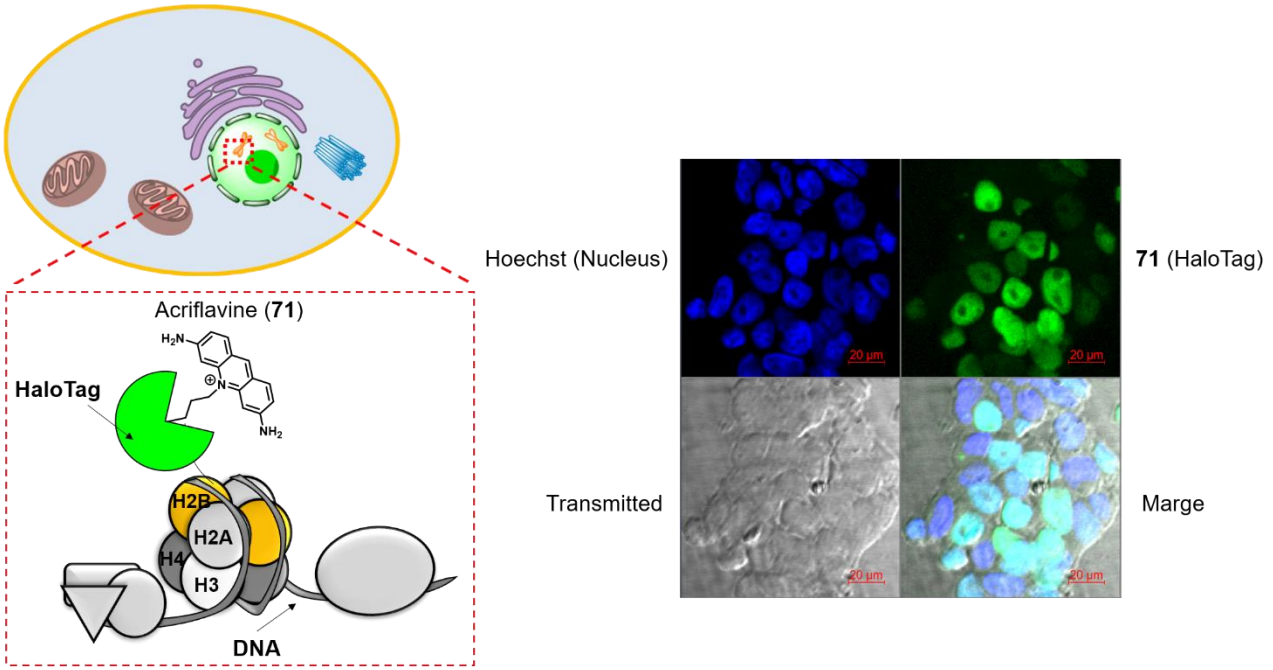


Figure 5-12. HaloTag-H2B を強制発現させた HEK293FT 細胞内における acriflavine **71** の局在

しかしながら acriflavine は DNA のインターカレーターとして知られているため、非共有結合性の相互作用によって核内に局在している可能性がある [4]。acriflavine **71** で処理した HaloTag-H2B を発現した HEK293FT 細胞を SDS-PAGE sample buffer によって破砕・変性し、共有結合によって acriflavine **71** が POI に連結しているか評価した（Figure 5-13）。SDS-PAGE の条件下ではタンパク質は変性するため、非共有結合で結合した低分子はタンパク質から解離する。変性条件下においても acriflavine の蛍光が HaloTag-H2B から検出され、acriflavine は細胞内で共有結合によって HaloTag-H2B に連結していることが明らかとなった。さらに、acriflavine の処理時間の検討を行ったところ 2 時間以上の処理では HaloTag-H2B 上の acriflavine の蛍光強度はほとんど変化していない。このため 2 時間の acriflavine の処理によって HaloTag-H2B との結合が完了することが明らかとなった。

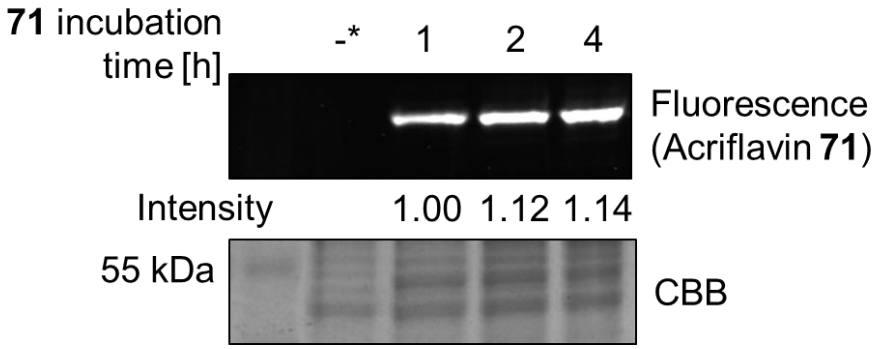


Figure 5-13. HaloTag-H2B に対する acriflavine **71** 結合量の時間依存性の評価（*HaloTag-H2B を発現していない HEK293FT 細胞に対して **71** を処理）

5-6-2. Acriflavine 光触媒による H2B を解析対象とした iPPL 法の検討

前節では核内の HaloTag-H2B 上に acriflavine **71** が共有結合を介して局在していることを明らかとした。acriflavine **71** で処理した細胞に対して MAUra-DTB を添加し、青色光照射を行った(Figure 5-14a)。細胞内においても acriflavin **71** は近接ラベル化の触媒として機能しており、HaloTag-H2B が発現している細胞でラベル化を行った場合のみ MAUra-DTB によってラベル化される複数のタンパク質が検出された（lane 1 vs. 2）。抗 HaloTag 抗体を用いた western blot を行ったところ、Streptavdin-HRP で検出されている 55 kDa 付近のラベル化タンパク質と HaloTag タンパク質のバンドが一致した。このことから、acriflavine が連結した HaloTag-H2B がラベル化されていることが示された（Figure 5-14b）。また前述したとおり、ヒストンは 8 つのモノマーからなる複合体である。そのため、POI のみならず相互作用タンパク質もラベル化することができるのであれば、内在性のヒストン（H2A、H2B、H3、H4）もラベル化されるはずである。そこで光照射によるラベル化後、細胞を破砕し、ラベル化タンパク質をアビジンビーズによって精製した。精製したタンパク質を溶出後、SDS-PAGE を行い、抗ヒストン抗体による Western blot を行った（Figure 5-14c）。H2A、H2B、H3 および H4 のいずれのモノマーも HaloTag-H2B 発現条件でのみ検出することができた。すなわち、光触媒近接ラベル化によって、POI のみならず、相互作用タンパク質もラベル化できることが明らかとなった。

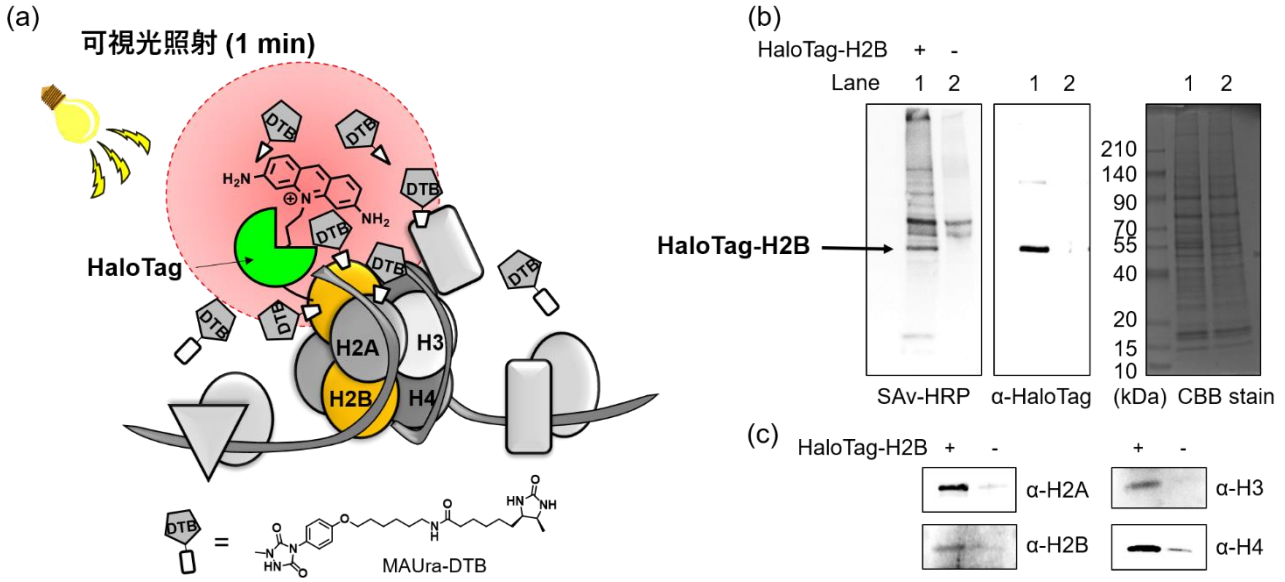


Figure 5-14. HaloTag-H2B を強制発現させた HEK293FT 細胞での iPPL 法の検討 (a) ヒストンラベリングの模式図 (b) ラベル化タンパク質（SAv-HRP）および抗 HaloTag 抗体による Western blot (c) 精製したラベル化タンパク質の抗ヒストン抗体による western blot

また、HaloTag-H2B が発現していない場合にも 70 kDa 付近にラベル化タンパク質が検出されている（Figure 5-14b, lane 2）。このラベル化タンパク質は光非照射時（Figure 5-15, lane 1, 2, 4, 6）および acriflavin **71** を処理しない場合（lane 1, 3, 4, 7）にも MAUra-DTB 添加条件下であれば検出された（lane 4, 6, 7, 8）。このことから細胞内環境で内在性の酸化剤により MAUra が酸化されラベル化反応が進行している可能性がある。この MAUra 添加時に出現するラベル化バンドは光照射時や acriflavine 添加時に増加している。細胞内在性のフラビンや Hemin は光増感剤となり、フラビン光触媒下タンパ

ク質をラベル化した例が報告されている [5a]。フラビンは酸化還元反応の補因子であるため細胞内に普遍的に存在することが予想される。実際にフラビンを補酵素として持つグルコースオキシダーゼ（GOx）では青色光に応答してフラビン結合ドメイン中のチロシンを一電子的に酸化しチロシルラジカルを形成することが報告されている [5b]。また、概日リズムに大きく関与するタンパク質群である Cryptochromes (CRYs) はフラビンの光励起を経由した一電子移動を契機としてシグナル伝達を起こすことも示唆されている [5c]。このことから、このラベル化バンドは内在性のフラビンタンパク質であると考察している。さらに、光照射をした場合に acriflavine の蛍光強度が減少することが明らかとなった（lane 5, 8）。この結果は acriflavine が細胞内環境での光照射によって徐々に失活しているためであり、後述の検討でも光照射に伴い acriflavine が失活していくことを示している。

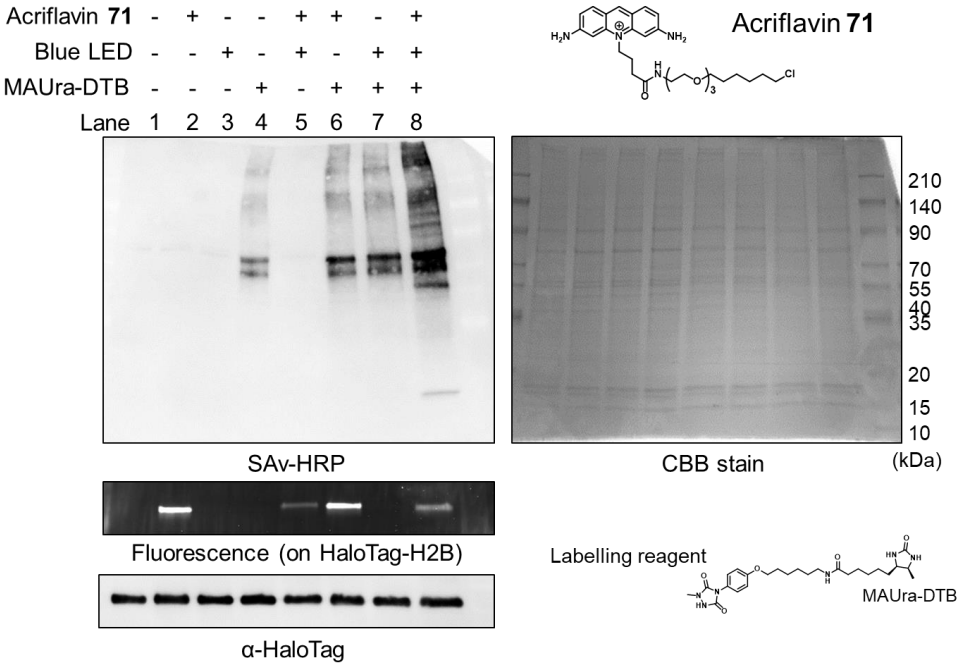


Figure 5-15. 種々の条件下におけるラベル化反応の検討

光照射時間の最適化を行ったところ 10 ~ 60 秒の光照射では照射時間の増加につれてラベル化効率が向上した（Figure 5-16, lane 1-5）。しかし 60 秒の光照射と 180 秒の光照射ではラベル化効率はほとんど変わらなかった（lane 5, 6）。光照射の増加に伴い acriflavine の蛍光が減少しており、60 秒ではほとんどその蛍光は観測されていないことから、60 秒以降の光照射では acriflavine 光触媒が失活しラベル化反応が進行しないことが示唆された。ラベル化反応の進行が完結する 60 秒の光照射時間を最適条件とし以降の検討で用いた。また、抗 HaloTag 抗体による Western blot を行ったところ、光照射条件下では高分子量領域に抗 HaloTag 抗体により染色されるタンパク質が表れた。これは acriflavine 触媒の一電子移動によって生じるチロシルラジカルがホモカップリングを起こし、タンパク質同士でクロスリンクしたためである。このことから、本手法はラベル化のみでなく、わずかではあるが相互作用タンパク質同士のクロスリンク反応も進行させることが明らかとなった。

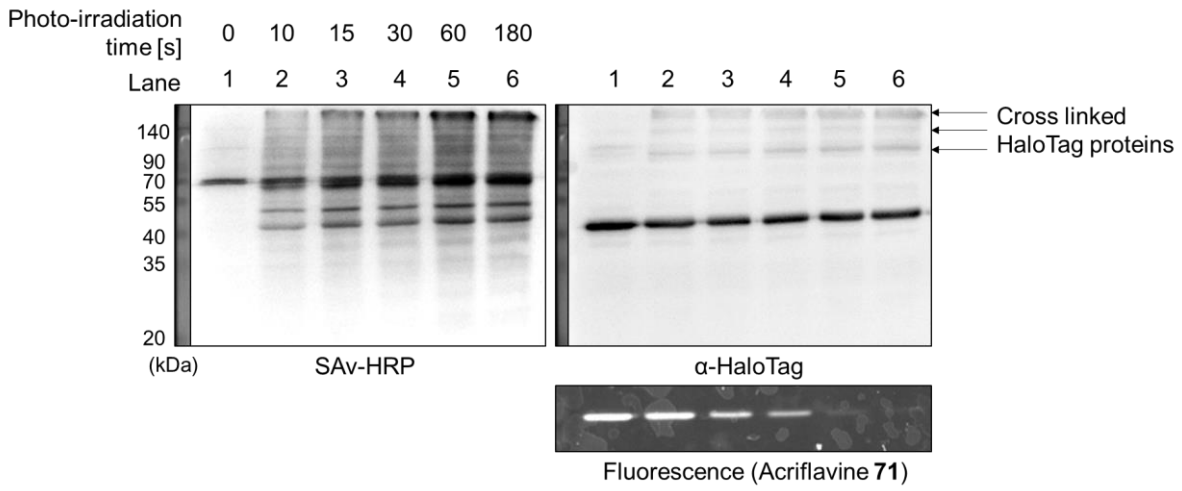


Figure 5-16. ラベル化反応の光照射時間の検討

5-6-3. nanoLC-MS/MS による H2B 相互作用タンパク質の解析

前節まででは acriflavine **71** 触媒下、細胞内環境で POI および内在性のヒストン（H2A, H2B, H3, H4）をラベル化することに成功した。既知の相互作用タンパク質を解析する場合には western blot 法で解析が可能であるが、複数の相互作用タンパク質や未知の相互作用タンパク質を網羅的に解析することは容易ではない。そこで MAUra-DTB によりラベル化を受けたタンパク質を第 4 章と同様にアビジンビーズを用いて精製し、Orbitrap nanoLC-MS/MS によって同定することとした（Figure 5-17a）。前節と同様に HaloTag-H2B を強制発現させた HEK293FT 細胞に対して acriflavine **71** を処理したのち、MAUra-DTB を添加し光照射を行うことで H2B に相互作用するタンパク質をラベル化した。このラベル化後の細胞を破砕し、アビジンビーズによる精製・トリプシン消化を行い、ペプチド消化サンプルを得た（light+）。一方で、ネガティブコントロールとして、同様の条件で光照射を行わず、アビジン精製・トリプシン消化を行ったサンプルも調製した（light-）。light+サンプルおよび light-サンプルのそれぞれについて nanoLC-MS/MS 測定を 3 回行い（n = 3）検出されたペプチド断片の intensity を比較した。nanoLC-MS/MS により合計 87 種類のタンパク質が検出され、ペプチドの検出強度 light+/light- > 2、かつ $p > 0.05$ となるタンパク質群を抽出したところ 33 種類のタンパク質が有意な H2B との相互作用タンパク質として検出された（Figure 5-17b）。これら 33 種類のタンパク質の局在は 30 種類が核局在であり染色体構成タンパク質は 16 種類含まれていることがわかった（Table 5-1）。このことから本ラベル化反応は核内で進行していることが裏付けられた。また、同定されてきたタンパク質は、タンパク質の配列情報のデータベースである Mascot を使用したが、同定されてきたタンパク質の遺伝子情報のデータベースを参照すれば、タンパク質の機能や生物学的経路の役割について分類することができる（遺伝子オントロジー解析 : GO）。そこで 33 種類の有意なラベル化タンパク質について GO 解析を行い、protein containing complex について検出されたタンパク質を分類した（Figure 5-17c）。内在性ヒストンで構成される nucleosome の他に ribonucleoprotein complex や spliceosomal complex など RNA 結合タンパク質が有意にラベル化を受けていることが本解析により明らかとなった。RNA 結合タンパク質は選択的スプライシングの際に、ヒストン上の翻訳後修飾（リジンのアセチル化、メチル化）を認識して splicing regulator をリクルートすることが知られている[6]。実際に今回の光触媒近接ラベル化で同定された SFPQ[6c] や NCL[7] は H2B と相互作用することも報告さ

れている（Table 5-1）。このことから本ラベル化は POI である H2B の近傍で進行していることが示唆された。

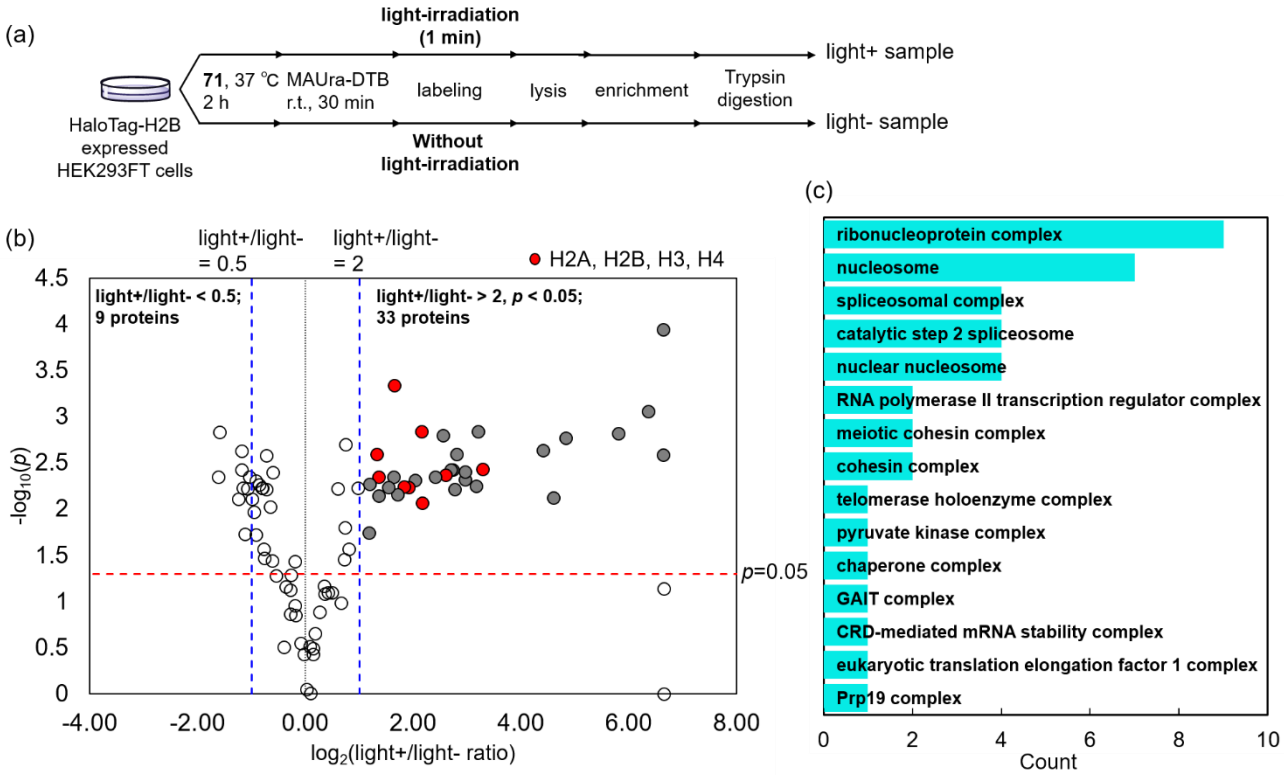


Figure 5-17. HaloTag-H2B 相互作用タンパク質の解析 (a) H2B を POI とした iPPL から Orbitrap nanoLC-MS/MS 解析までのスキーム (b) ラベル化タンパク質のボルケーノプロット。（赤破線： p = 0.05、青破線： light+/ light- ration = 0.5 or 2、light+/ light- ratio > 2, p < 0.05 となるタンパク質を灰色のドット、内在性ヒストンを赤色のドットで示した) (c) light+/ light- ratio > 2, p < 0.05 となるタンパク質の GO 解析、Uniprot のデータベースを用いて protein containing complex について分類した。

Table 5-1. light+/ light- > 2, $p < 0.05$ となったラベル化タンパク質のリストと局在するオルガネラ

Accession	Description	$\log_2$(light+/light-)	$-\log_{10}p$	Cellular Component
Q9P258	Protein RCC2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RCC2 PE=1 SV=2	6.64	3.94	chromosome;cytoplasm;cytoskeleton;cytosol;membrane;nucleus
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 PE=1 SV=3	6.64	2.58	membrane;mitochondrion;nucleus;organelle lumen
P18669	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2	6.37	3.06	cytoplasm;cytosol;extracellular;membrane;organelle lumen
P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=2	5.82	2.82	cytoplasm;cytoskeleton;cytosol;membrane;nucleus
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2	4.84	2.77	chromosome;cytoplasm;nucleus
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	4.60	2.12	cytoplasm;cytoskeleton;cytosol;membrane;nucleus
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5	4.42	2.63	cytoplasm;membrane;nucleus;spliceosomal complex
Q71UI9	Histone H2A.V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AFV PE=1 SV=3	3.29	2.43	chromosome;nucleus
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDC1 PE=1 SV=3	3.21	2.84	chromosome;nucleus
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4	3.18	2.25	membrane;nucleus
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	2.97	2.31	cytoplasm;cytosol;endosome;extracellular;membrane;nucleus;organelle lumen;spliceosomal complex
P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3	2.97	2.40	cytoplasm;membrane;nucleus
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMC1A PE=1 SV=2	2.81	2.59	chromosome;cytosol;nucleus
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMC3 PE=1 SV=2	2.78	2.21	chromosome;cytosol;nucleus
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	2.75	2.43	cytoplasm;extracellular;membrane;nucleus;spliceosomal complex
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6	2.70	2.43	Cell surface; chromosome; cytoplasm;membrane; nucleus; spliceosomal complex
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2	2.60	2.37	chromosome;extracellular;membrane;nucleus
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUMA1 PE=1 SV=2	2.56	2.79	chromosome;cytoplasm;cytoskeleton;cytosol;membrane;nucleus
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2	2.42	2.35	cytoplasm;cytosol;membrane;nucleus
Q96A08	Histone H2B type 1-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC1 PE=1 SV=3	2.17	2.07	chromosome;nucleus
Q7L7L0	Histone H2A type 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST3H2A PE=1 SV=3	2.16	2.84	chromosome;nucleus
P0DMV9	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1	2.05	2.31	cytoplasm;cytoskeleton;cytosol;endoplasmic reticulum;extracellular;mitochondrion;nucleus
Q99878	Histone H2A type 1-J OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AC14 PE=1 SV=3	1.92	2.23	chromosome;nucleus
Q8N257	Histone H2B type 3-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST3H2BB PE=1 SV=3	1.84	2.24	chromosome;cytosol;nucleus
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1	1.71	2.16	cytoplasm;membrane;nucleus;spliceosomal complex
P84243	Histone H3.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3A PE=1 SV=2	1.66	3.34	chromosome;extracellular;nucleus
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1	1.64	2.35	cytoplasm;nucleus
P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	1.55	2.23	cytoplasm;cytosol;extracellular;mitochondrion;nucleus;organelle lumen
P68363	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1B PE=1 SV=1	1.37	2.14	cytoplasm;cytoskeleton;membrane
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST2H2BF PE=1 SV=3	1.37	2.35	chromosome;cytosol;nucleus
P0DPK5	Putative histone H3.X OS=Homo sapiens OX=9606 PE=5 SV=1	1.33	2.59	chromosome;nucleus
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA6 PE=1 SV=2	1.20	2.27	cytoplasm;cytosol;extracellular;organelle lumen
P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2	1.19	1.74	cytoplasm;cytoskeleton;extracellular;membrane;nucleus;organelle lumen

5-6-4. 従来法（BioID, APEX）と iPPL 法の比較

前述の通り、近年まで用いられている細胞内での相互作用タンパク質解析手法には BioID 法や APEX 法が汎用される。実際にクロマチンのプロテオーム解析においても、*BirA*-H2B を強制発現させた HEK293 細胞で、BioID 法を用いて H2B との相互作用タンパク質を解析した例が報告されている[8]。この報告例中でラベル化を受けたタンパク質を前節と同様のデータベースを用いて GO 解析を行った（Figure 5-18）。BioID 法では 210 種類のタンパク質が相互作用タンパク質として検出されており iPPL 法よりも多くのタンパク質が相互作用タンパク質として同定されている。一方で、光触媒近接ラベル化法で有意にラベル化を受けていた nucleosome や RNA 結合タンパク質は BioID 法では同定数が少ないことが分かった（210 種類中で nucleosome: 3、ribonucleoprotein: 10 など）。さらに、ヒストンから解離した DNA 上に結合するタンパク質 protein DNA coplex, transcription regulator, DNA repair complex などがラベル化を受けていることも明らかとなった。

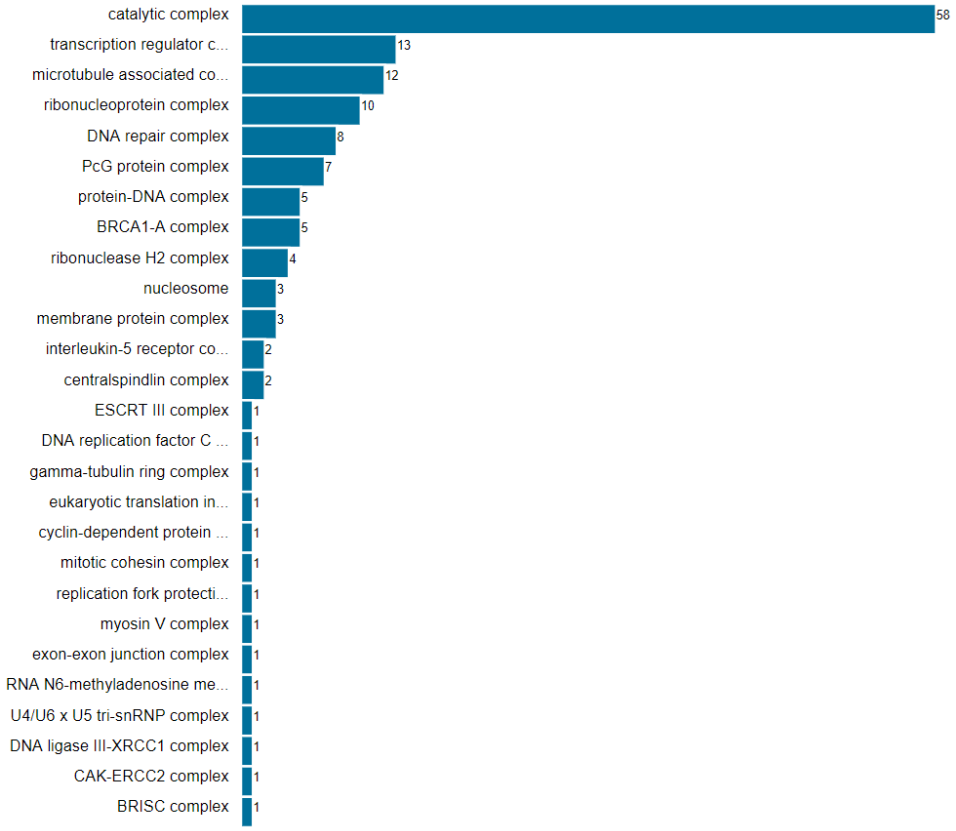


Figure 5-18. BioID 法で同定された H2B 相互作用タンパク質の GO 解析. J.-P. Lambert らのデータ[7]を Uniprot のデータベースを用いて再解析した。

BioID 法は一般的におよそ 10 nm 以内のラベル化半径を有していることが明らかとなっている。一方で nucleosome は DNA を含めても直径は 10 nm 未満である。BioID 法では H2B より離れたタンパク質に対してもラベル化反応が進行したものであると捉えることができる。実際に、BioID 法でラベル化を受けているタンパク質のうち DNA methyltransferase 3A（DNMT3A）と nucleosome の結晶構造が明らかとなっている。DNMT3A は DNA のメチル化を行うほか、H3 の翻訳後修飾を認識し DNA メチル化機構を制御することなどが知られているものの H2B との直接の相互作用は報告例がない[9]。DNMT3A-nucleosome の結晶構造から HaloTag 連結部位である H2B の N 末端と DNMT3A の距離を

計算したところ、H2B の N 末端から DNMT3A はおよそ 10 nm 離れており、BioID のラベル化半径と合致することが明らかとなった（Figure 5-19）。DNMT3A は iPPL 法ではラベル化されていないことから、iPPL 法は BioID よりも小さなラベル化半径（< 10 nm）を有していることが示唆された。

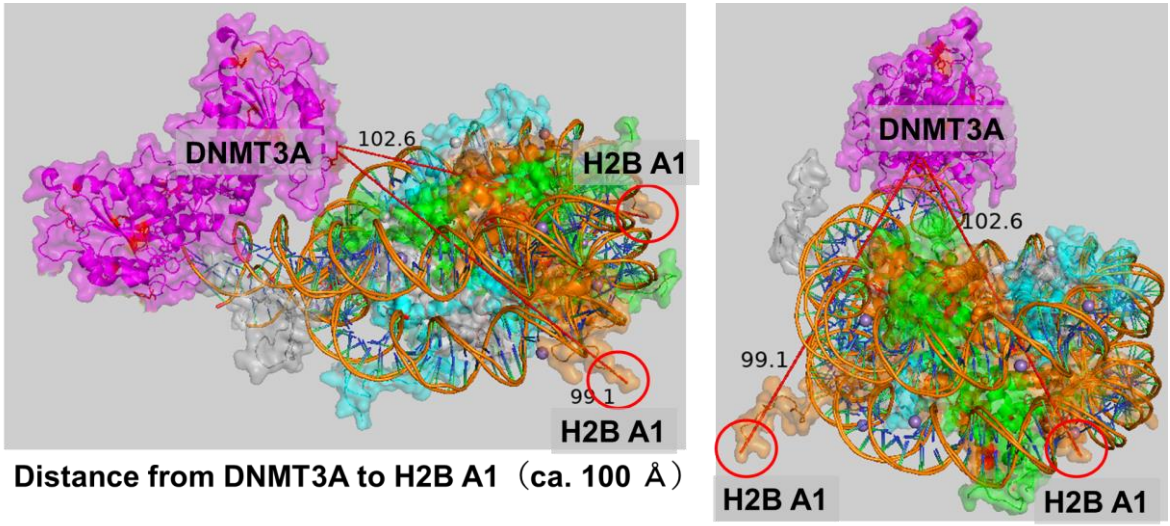


Figure 5-19. DNMT3A と nucleosome の結晶構造と距離の計算（PDB: 1kx5 (nucleosome), 6pa7 (nucleosome-DNMT3A), magenta: DNMT3A, green: H2A, orange: H2B, gray: H3, cyan: H4, red: tyrosine residue）

また、iPPL 法では、BioID 法ではあまりラベル化を受けていない nucleosome や RNA 結合タンパク質を選択的にラベル化できている（Figure 5-17）。すなわち、iPPL 法は POI に近接するタンパク質を選択的にラベル化できることが示唆される。Nucleosome に対する相互作用タンパク質はヒストンの N 末端から 20 残基程度ある tail 上の翻訳後修飾を認識する。そのため、ヒストンの tail 間の距離を見積もることでおおよそのラベル化半径を見積もることができると予想した。特に iPPL 法でラベル化されたタンパク質のうち SFPQ や NONO は H2A の tail 上のアセチル化を認識することが明らかとなっている。そこで H2B と H2A の tail 間の距離を nucleosome の結晶構造から見積もったところ最短で 3 nm 程度、平均して 6 nm 程度 tail 間の距離が離れていることが明らかとなった（Figure 5-20）。前述の通り HaloTag の直径が 4.5 nm 程度であることから（Figure 5-7a）最短距離である 3 nm より大きなラベル化半径を有していることが予想される。そのため iPPL 法はおよそ 6 nm のラベル化半径を有していると考えられる。この距離は HaloTag の直径である約 4.5 nm と MAUra のラベル化半径である約 1 nm を足し合わせるとちょうど約 6 nm 程度となることからも理にかなっている。

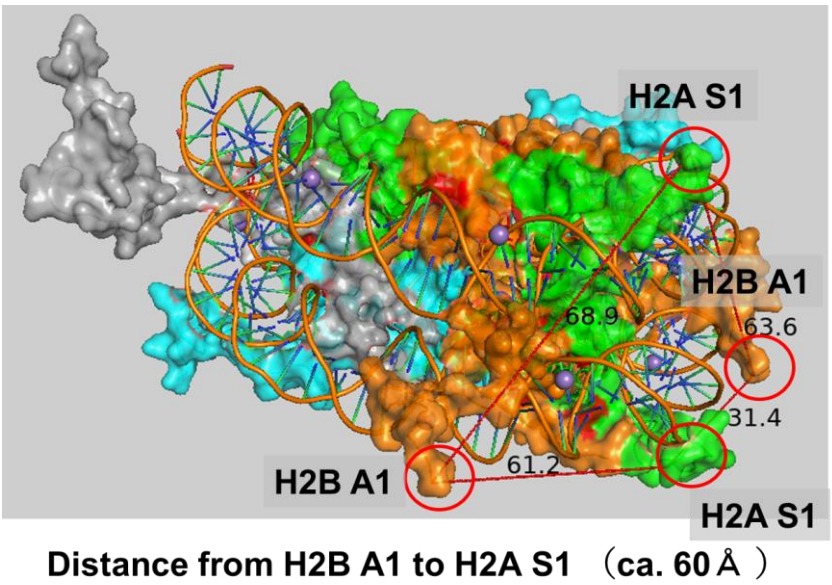


Figure 5-20. ラベル化距離の計算（PDB: 1kx5 green: H2A, orange: H2B, gray: H3, cyan: H4, red: tyrosine residue）

前述した DNMT3A は DNA 上もしくは H3 の tail 上に存在する。H3 の tail や H4 の tail は DNMT3A 以外にも種々の DNA 関連タンパク質や翻訳後修飾に関わる酵素と相互作用することがわかっている [10]。そこで H2B の tail から H3 や H4 の tail の距離を見積もることとした（Figure 5-21）。すると H3 との tail は約 11 nm、H4 の tail は約 8 nm 程度 H2B の tail から離れていることが明らかとなった。すなわち 6 nm のラベル化半径では H3 や H4 関連タンパク質はほとんどラベル化されないことが示唆された。

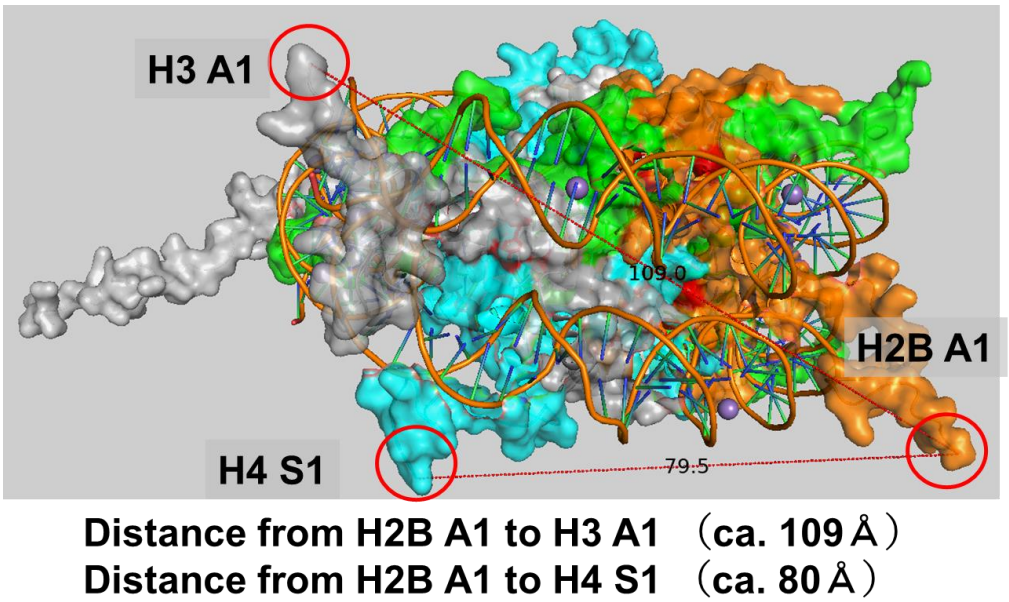


Figure 5-21. H2B tail から H3 および H4 の tail 間距離の計算（PDB: 1kx5 green: H2A, orange: H2B, gray: H3, cyan: H4, red: tyrosine residue）

以上の結果は H2B との関連の深いタンパク質を選択的にラベル化できることを支持する結果である。前述の通り nucleosome は DNA を含めて 10 nm 程度のタンパク質複合体であるため、10 nm のラベル化半径を有する BioID 法では同一 nucleosome 内で H3, H4 関連タンパク質や H2A, H2B 関連タンパク質をラベル化で区別することは困難である。すなわち、iPPL 法の約 6 nm のラベル化半径は関連の深いタンパク質、そうでないタンパク質をラベル化で区別することができ、より詳細な PPI の情報を得られることが期待される。

また、BioID のみでなく、APEX 法との比較検討も行った。APEX 法は BioID と比較するとラベル化半径はおよそ 20 nm と広いものの、iPPL 法と同様に 1 分間という短いラベル化時間で PPI を解析することができる手法である。APEX-H2B を強制発現させた HEK293FT に対して tyramide-DTB を処理し、過酸化水素存在下ラベル化を行った（Figure 5-22a）。一方で HaloTag-H2B を強制発現させた HEK293FT 細胞に対して Acriflavine **21** を処理したのち、MAUra-DTB を添加し光照射を行うことで H2B に相互作用するタンパク質をラベル化した（Figure 5-22b）。この両者のラベル化タンパク質の比較を行ったところ、APEX 法では APEX-H2B、内在性ヒストンの他に多くのタンパク質を高い効率でラベル化する一方で、iPPL 法では HaloTag-H2B や内在性ヒストンが高い選択性でラベル化を受けている。この APEX 法と iPPL 法のラベル化パターンの違いは BioID 法との違いと同様にラベル化半径の違いを反映していると考えられる。

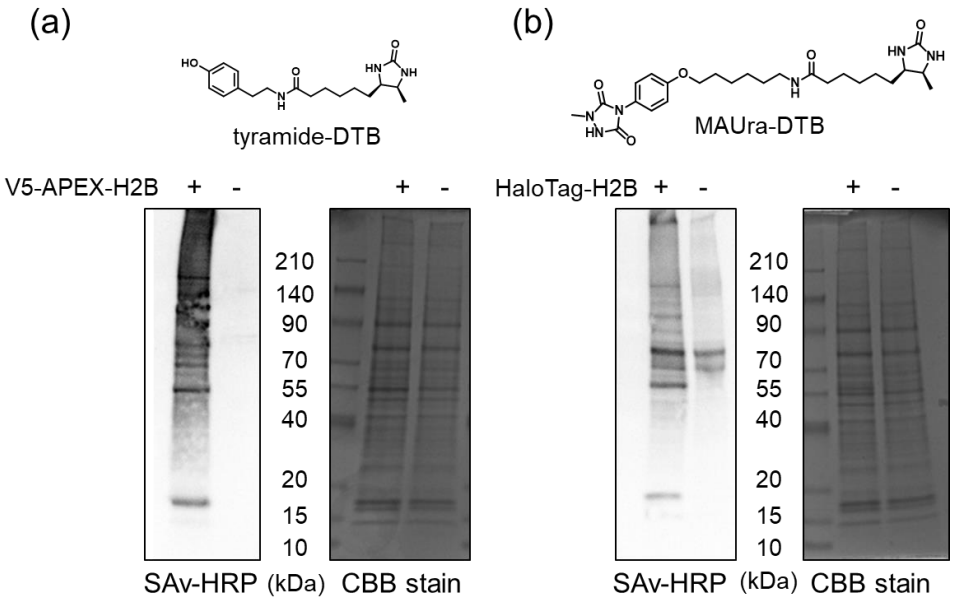


Figure 5-22. APEX 法と iPPL 法の比較 (a) V5-APEX-H2B を発現した HEK293FT 細胞で tyramide-DTB によってラベル化 (b) HaloTag-H2B を発現した HEK293FT 細胞で tyramide-DTB によってラベル化

以上のことから、本章で開発した iPPL 法は従来法よりも小さなラベル化半径（およそ 6 nm）を有しており、POI に直接相互作用するタンパク質が選択的にラベル化できることが示唆された。ナノメートルオーダーの局所的なラベル化反応によって、POI の直接相互作用タンパク質を解析可能な手法は McMilan らによって報告された MicroMap 法のみしか例がない[11]。しかしながら MicroMap 法は細胞膜上のタンパク質に解析対象が限定される。すなわち iPPL 法は、細胞内でナノメートルオーダーの局所的なラベル化を可能にした初めての例である。

5-7. 第五章のまとめ

本章では第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を用い、POI の相互作用タンパク質の選択的なラベル化を志向した、細胞内光触媒近接ラベル化法 iPPL を確立した。iPPL に最適な細胞膜透過性の高い有機光触媒を光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質ラベル化によってスクリーニングを行った。スクリーニングにおいて、タンパク質吸着性が低く、POI を選択的にラベル化可能な BODIPY、クマリンおよび、高いタンパク質吸着性を有し光触媒担持ビーズ上ではリガンド非依存的なラベル化反応が進行する acriflavine といった光触媒を見出すことに成功した。これらの光触媒に HaloTag リガンドを連結し、細胞膜上の HaloTag-POI に対するモデルの光触媒近接ラベル化を試みたところ、タンパク質吸着性の低い光触媒ではラベル化反応がほとんど進行せず、タンパク質吸着性の高い acriflavine 光触媒によって HaloTag-POI を用いた近接ラベル化が可能になることを見出した。Acriflavine 光触媒を用い、10 nm 程度の直径のタンパク質含有複合体 nucleosome に対して iPPL 法を適用した。H2B を POI とした iPPL 法を実施したところ、細胞内環境においても acriflavine は HaloTag-POI で近接ラベル化反応を可能にすることが明らかとなった。iPPL 法は 1 分間の可視光照射という迅速かつ温和な条件で、従来法（BioID 法、APEX 法）よりも局所的空間で POI および相互作用タンパク質をラベル化できる。BioID のラベル化半径はおよそ 10 nm と言われており、H2B から離れた距離にある H3 関連タンパク質や H4 関連タンパク質、DNA 結合タンパク質もラベル化できる。一方、iPPL 法は H2B の関連タンパク質や H2B と非常に近い距離に存在する H2A の関連タンパク質を選択的にラベル化できることが明らかとなった。本研究で開発した iPPL は、6 nm のラベル化半径もつことから細胞内微小環境における隣接した PPI を高精度に解析できる初めての手法である。

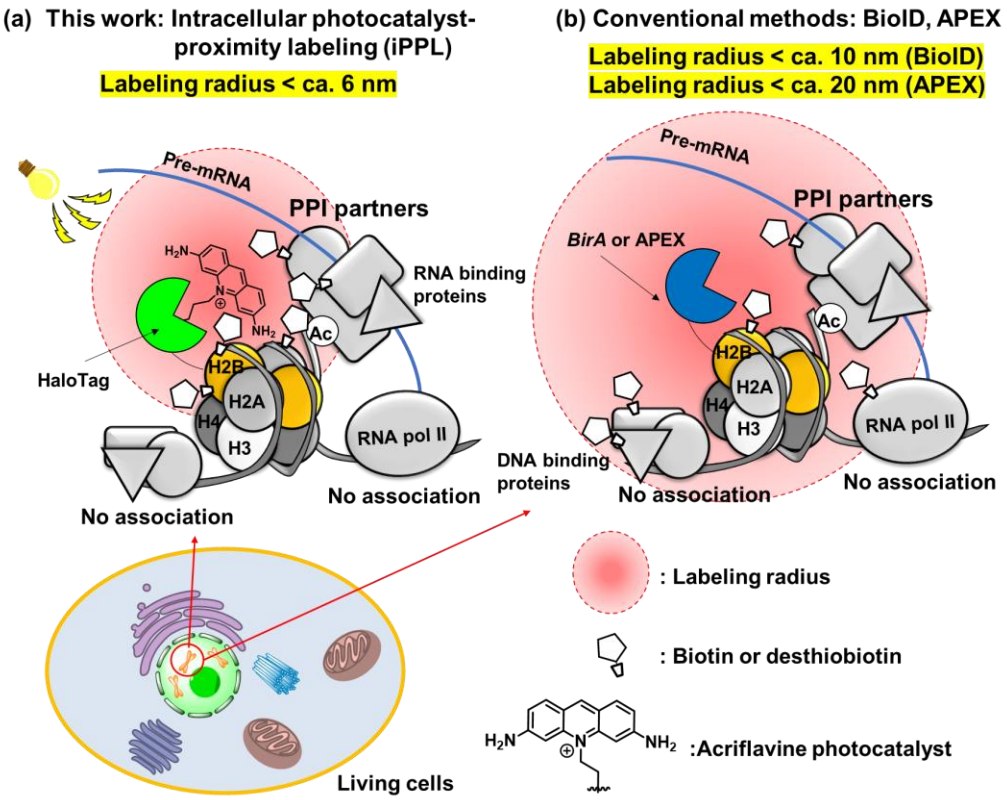


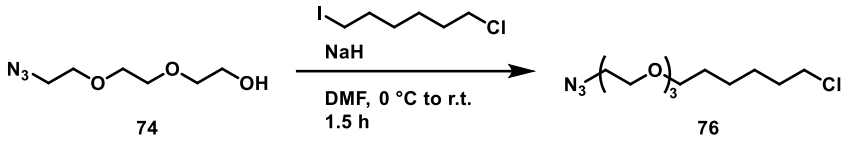
Figure 5-22. 第五章のまとめ

5-8. Referance

1. Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ACS Chem. Biol.* **2008,** *3,* 373.
2. N. A. Romeo and D. A. Nicewicz, *Chem. Rev.* **2016,** *116,* 10075−10166.
3. (a) H. Ummethum and S. Hamperl, *Front. Genet.* **2020,** *11,* 450. DOI: 10.3389/fgene.2020.00450, (b) R. E. Kleiner, L. E. Hang, K. R. Molloy, B. T. Chait, T. M. Kapoor, *Cell Chem. Biol.* **2018,** *25,* 110–120. (c) J.-P. Lambert, M. Tucholska, C. Go, J.D.R. Knight, A.-C. Gingras, *J. Proteomics* **2015,** *118,* 81-94.
4. M. Wainwright, *J. Antimicrob. Chemother.,* **2001,** *47,* 1-13.
5. (a) S. Bloom, C. Liu, D. K. Kölmel, J. X. Qiao, Y. Zhang, M. A. Poss, W. R. Ewing, D. W. C. MacMillan, *Nat. Chem.* **2017,** *10,* 205-211. (b) L. Nag, A. Lukacs, M. H. Vos, *ChemPhysChem* **2019,** *20,* 1793–1798. (c) K. S. Conrad, C. C. Manahan, B. R. Crane, *Nat. Chem. Biol.* **2014,** *10,* 801-809.
6. (a) H-. L. Zhou, G. Luo, J. A. Wise, and H. Lou, *Nucleic Acids Res.,* **2014,** *42*, 701–713. (b) T. A. Soboleva, B. J. Parker, M. Nekrasov, G. H-. Smith, Y. J. Tay, W-. Q. Tng, *et al*., *PLoS Genet*. **2017**, *13*, e1006633. (c) Y-. E. Kim, C. Park, K. E. Kim, K. K. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **2018**, *499*, 30-36.
7. A. S. Gupta, G. Joshi, S. Pawar, K. Sengupta, *Nucleus* **2018**, *9*, 350-367.
8. J.-P. Lambert, M. Tucholska, C. Go, J.D.R. Knight, A.-C. Gingras, *J. Proteomics,* **2015**, *118*, 81-94.
9. (a) X. Guo, L. Wang, J. Li, *et al., Nature* **2015**, *517*, 640‑644. (b) D. N. Weinberg, S. P-. Cavanagh, H. Chen, *et al., Nature* **2019**, *573*, 281-286.
10. (a) F. Wang, J. M. G. Higgins, *Trends Cell Biol.*, **2013,** *23,* 175-184. (b) B. Li, M. Carey, J. L. Workman, *Cell* **2007,** *128,* 707-719.
11. J. B. Geri, J. V. Oakley, T. Reyes-Robles, T. Wang, S. J. McCarver, C. H. White, F. P. Rodriguez-Rivera, D. L. Parker Jr., E. C. Hett, O. O. Fadeyi, R. C. Oslund, D. W. C. MacMillan, *Science* **2020**, *367*, 1091–1097.

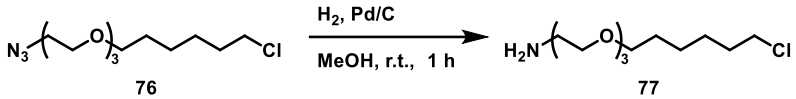
Experimental section

Synthesis of compounds. 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**74**)[4] and BODIPY FL carboxylic acid (**75**)[5] were synthesized according to previously reported procedure.

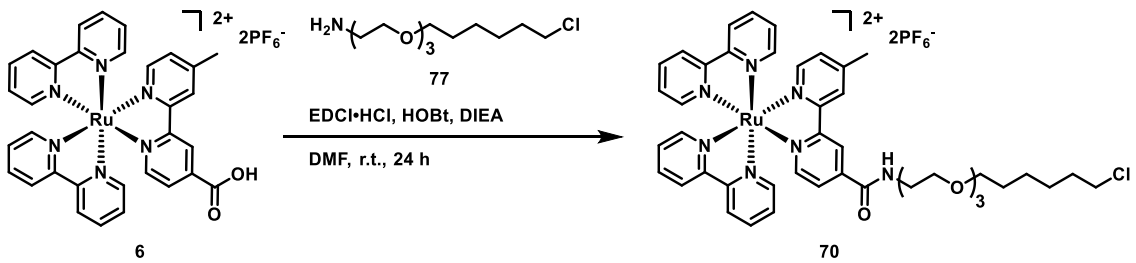


1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-chlorohexane (76, azide containing HaloTag ligand). To a solution of **74** (232.3 mg, 1.33 mmol) in 1.0 mL of DMF was added NaH (60%, dispersion in paraffin liquid, 63.6 mg, 1.59 mmol) at 0 °C. After stirring at 0 °C for 30 min, to a solution of 1-chrolo-6-iodohexane (490.6 mg, 1.99 mmol) in 1.0 mL of DMF was added the reaction mixture at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 h, reaction was quenched by addition of aqueous HCl solution (1 M) and AcOEt, extracted with AcOEt, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography with Hexane : AcOEt = 3 : 1 to give **76** as a colorless oil (128.4 mg, 0.585 mmol, 44%).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.69-3.65 (m, 8H), 3.60-3.58 (m, 2H), 3.53 (t, J = 6.7 Hz, 2 H), 3.46 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.91 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.78 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.63-1.57 (m, 2H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.40-1.34 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 71.3, 70.9, 70.9, 70.8, 70.2, 70.2, 50.8, 45.2, 32.7, 29.6, 26.8, 25.6. FT-IR (neat) 2936, 2864, 2104, 1446, 1349, 1301, 1287, 1252, 1122 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{12}H_{24}ClN_3O_3$ $[M+Na]^+$: 316.1398, found 316.1397.



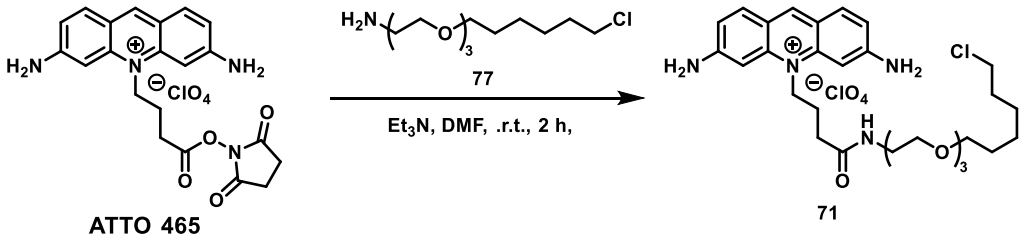
2-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (77, amine containing HaloTag ligand). To a solution of **76** (54.0 mg, 0.183 mmol) in 1.0 mL of MeOH was added 2.7 mg of Pd/C (50% moisture content). After stirring for 1 h under H_2 at room temperature, Pd/C was removed by Celite filtration and the filtrate was concentrated under the reduced pressure to give **77** as a colorless oil. The colorless oil was applied next step directly without further purification.



Synthesis of HaloTag ligand-conjugated Ru(bpy)$_3$ complex (70). To a solution of **6** (11.0 mg, 0.0120 mmol), HOBt・H_2O (2.8 mg, 0.0180 mmol) and **77** (3.9 mg, 0.0144 mmol) in 1.0 mL of DMF was added EDCI・HCl (2.8 mg, 0.0144 mmol) at room temperature. After stirring at room temperature for 24 h, reaction was quenched

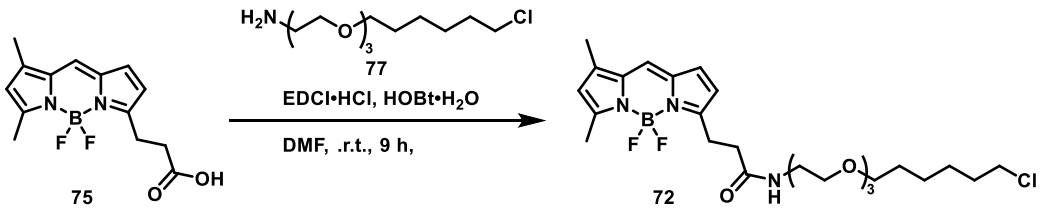
by addition of water (20 mL) and CH_2Cl_2 (10 mL), extracted with CH_2Cl_2, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (20-100% MeCN/H_2O) to give **70** as a red oil (3.9 mg, 0.0033 mmol, 28%).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ 9.08 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 4 H), 8.05 (td, *J* = 7.8, 9.1 Hz, 4H), 7.83 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.75-7.70 (m, 5H), 7.54 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.40-7.36 (m, 4H), 7.26 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 3.65-3.63 (m, 2H), 3.59-3.52 (m, 10H), 3.45-3.43 (m, 2H), 3.31 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.69 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.76 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.45-1.41 (m, 2H), 1.38-1.32 (m, 2H), 1.29-1.22 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN δ 164.2, 158.8, 158.0, 157.9, 157.9, 157.8, 157.1, 153.2, 152.7, 152.6, 152.5, 151.8, 151.7, 143.5, 140.6, 138.8, 138.8, 138.7, 129.6, 128.6, 128.5, 126.7, 125.8, 125.2, 125.2, 122.6, 71.5, 71.0, 70.8, 70.7, 69.8, 46.1, 40.8, 33.2, 30.1, 27.2, 26.1, 21.1. FT-IR (neat) 3413, 3111, 3080, 2930, 2864, 1677, 1542, 1465, 1446, 1201, 1132 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{44}H_{50}ClN_7O_4Ru$ $[M]^{2+}$: 438.6323, found 438.6326.



Synthesis of HaloTag ligand conjugated acriflavine (71). To a solution of ATTO 465 (5.0 mg, 0.010 mmol) in 1.0 mL of DMF were added **26** (from a 100 mM stock solution in DMF, 0.010 mmol) and Et_3N (from a 100 mM stock solution in DMF) at room temperature. After stirring at room temperature for 2 h, DMF was removed under reduced pressure. The residue was purified by HPLC (10-80% MeCN/H_2O) to give **71** as a yellow oil (5.7 mg, 0.0088 mmol, 88%).

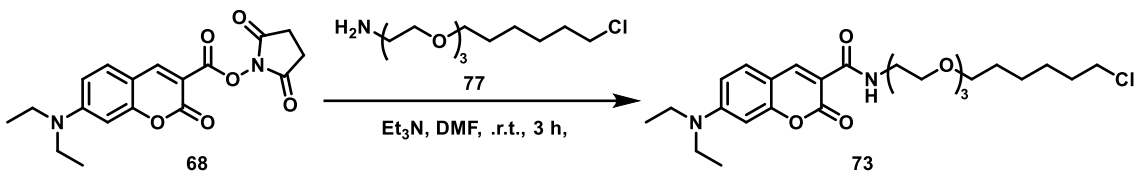
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.61 (s, 1H), 8.50 (brs, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.4 Hz, 2 H), 7.04-7.01 (m, 4H), 4.57-4.54 (m, 2H), 3.65-3.62 (m, 6H), 3.58-3.56 (m, 2H), 3.53-3.47 (m, 6H), 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.25-2.20 (m, 2H), 1.71 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.52 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.44-1.38 (m, 2H), 1.35-1.30 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.7, 159.3, 144.9, 144.7, 135.0, 118.7, 118.1, 94.9, 72.1, 71.6, 71.5, 71.2, 71.1, 70.5, 45.7, 40.5, 33.7, 32.6, 30.5, 27.7, 26.5, 22.6; FT-IR (neat) 3353, 3207, 2931, 2863, 1651, 1599, 1496, 1386, 1326, 1192 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{29}H_{42}ClN_4O_4$ $[M]^+$: 545.2889, found 545.2889.



Synthesis of HaloTag ligand conjugated BODIPY (72). To a solution of **75** (11.2 mg, 0.0383 mmol) in 1.0 mL of DMF were added HOBt-H_2O (8.8 mg, 0.046 mmol), EDCI-HCl (8.8 mg, 0.046 mmol) and **77** (from a 100 mM stock solution in DMF, 0.0421 mmol) at room temperature. After stirring at room temperature for 9 h, the reaction was quenched by addition of water (20 mL) and AcOEt (20 mL). Organic layer was washed with

cold water (20 mL x 2), saturated aqueous NH_4Cl solution (20 mL x 2), saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (20 mL x 2) and brine (10 mL x 1). The organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by GPC to give **72** as an orange amorphous (5.7 mg, 0.0105 mmol, 27%).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.08 (s, 1H), 6.88 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 6.30-6.29 (m, 2H), 6.11 (s, 1H) 3.62-3.55 (m, 8H), 3.53-3.50 (m, 4H), 3.45-3.42 (m, 4H), 3.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.75 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.57 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.37-1.32 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 171.9, 160.1, 158.0, 143.8, 135.1, 133.5, 128.4, 123.8, 120.4,117.6, 71.3, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 70.0, 45.1, 39.4, 36.0, 32.6, 29.8, 29.5, 26.8, 25.5, 24.9, 15.0, 11.4; FT-IR (neat) 3314, 2930, 2864, 1659, 1606, 1529, 1487, 1443, 1252, 1174, 1135 cm^{-1}; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{26}H_{39}BClF_2N_3O_4$ $[M+Na]^+$: 564.2582, found 564.2586.



Synthesis of HaloTag ligand conjugated coumarin (73). To a solution of **68** (8.4 mg, 0.023 mmol) in 1.0 mL of DMF were added **77** (from a 100 mM stock solution in DMF, 0.046 mmol) and Et_3N (from a 100 mM stock solution in DMF, 0.046 mmol) at room temperature. After stirring at room temperature for 3 h, the reaction was quenched by addition of water (20 mL) and AcOEt (20 mL). Organic layer was washed with cold water (20 mL x 2), saturated aqueous NH_4Cl solution (20 mL x 2), saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (20 mL x 2) and brine (10 mL x 1). The organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography with AcOEt to give **73** as a yellow oil (11.9 mg, 0.023 mmol, 99%).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (brs, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.42 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 6.64 (dd, J = 2.4, 9.0 Hz, 1 H) 6.49 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.70-3.64 (m, 10H), 3.60-3.58 (m, 2H), 3.52 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.47-3.43 (m, 6H), 1.77 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.59 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.39-1.33 (m, 2H), 1.24 (t, J = 7.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 163.3, 162.6, 157.7, 152.6, 148.1, 131.2, 110.4, 109.9, 108.4, 96.6, 71.3, 70.8, 70.7, 70.6, 70.2, 69.9, 45.1, 39.5, 32.6, 29.5, 26.8, 25.5, 12.5; FT-IR (neat) 3341, 2969, 2933, 2866, 1703, 1618, 1584, 1531, 1515, 1418, 1352, 1230, 1189, 1135 cm^{-1} ; HRMS (ESI, Positive): *m/z* calced. for $C_{26}H_{39}ClN_2O_6$ $[M+Na]^+$: 533.2389, found 533.2388.

Photocatalyst screening. Preparation of photocatalyst **51**-**68** functionalized affinity beads and target protein labeling was operated according to our previous report[6]. Photocatalyst **51**-**68** was purchased from commercial sources. ATTO390-NHS (**51**, ATTO-TEC); ATTO425-NHS (**52**, ATTO-TEC); ATTO488-NHS (**55**, ATTO-TEC); ATTO495-NHS (56, ATTO-TEC); ATTO610-NHS (**57**, ATTO-TEC); ATTO465-NHS (**58**, ATTO-TEC); ATTO514-NHS (**59**, ATTO-TEC); ATTO520-NHS (**60**, ATTO-TEC); ATTO532-NHS (**61**, ATTO-TEC); ATTO565-NHS (**62**, ATTO-TEC); ATTO590-NHS (**63**, ATTO-TEC), BDP FL-NHS (**53**, Lumiprobe), BDP 558/568-NHS (**64**, Lumiprobe), BDP 581/591 (**65**, Lumiprobe), BDP RG6-NHS (**66**, Lumiprobe), BDP TMR-NHS (**67**, Lumiprobe), 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylicacid *N*-succinidimyl ester (**68**, invitrogen); 5-SFX (**54**, invitrogen).

Cell culture. HEK293FT cells were incubated with the RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Cells were incubated in a cell incubator with 5% CO_2 at 37 °C.

Plasmid preparation.

pFN21A/Halo-H2BA. The plasmid was purchased from Promega.

pcDNA3/V5-APEX2-H2B. Nuclear export signal (NES) sequence was removed from pcDNA3/V5-APEX2-NES (kindly provided from Prof. Hyun-Woo Rhee, Seoul National University) is amplified by PCR using primers (TAATAGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGC and GGCATCAGCAAACCCAAGCTCG). H2B sequence was obtained from pFN21A/Halo-H2BA using primers (GAGCCAACCACTGAGGATCTGTAC and CATGGTGGCTTTGCTAGCCCTATAG). The obtained H2BA sequence and pcDNA3/V5-APEX2 fragment were ligated with In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio Inc.).

pDisplay/CMV-V5-HaloTag-myc-TM. The vector, pDisplay/CMV-V5-APEX2-myc-TM (kindly provided from Prof. Hyun-Woo Rhee, Seoul National University) was amplified except APEX2 gene by PCR (primers: GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG and GGTGCTGTCCAGGCCCAG) and HaloTag gene amplified by PCR (primers: GGCCTGGACAGCACCATGGCAGAAATCGGTACTG and GATGAGTTTTTGTTCCTCCATGGCGATCGCGTT) from pFN21/HaloTag-HOMX1 (addgene, FHC09676) was ligated into it with In-Fusion HD cloning kit.

Transfect cells. Transfection of HaloTag-POI was operated according to protocol of Lipofectamine™ 3000 reagent (invitrogen).

Protein labeling in cells. HaloTag-POI transfected 293FT cells were incubated on 24 well plate (2×10^5 cells/well) in CO_2 incubator for 24 h. These cells were treated with ligand conjugated photocatalyst (**70-73**, from a 10 mM stock solution in DMF; final 1 μM in medium) and incubated in CO_2 incubator for 2 h. HaloTag-POI transfected 293FT cells were transferred to centrifuging tube, discard supernatant, add PBS and centrifuge (100 × g, 5 min, 4 °C) to remove albumin derived from medium and unbound photocatalyst. After discarding the supernatant, to the cells added 500 μL of 500 μM labeling reagent solution in PBS. The cells were incubated at room temperature for 30 min, and operated photo-irradiation on ice for 1 min. After the labeling reaction, reaction was quenched by addition of 1 x SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 125 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% bromophenol blue (BPB), 10% glycerol) and heated at 95 °C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE using 4-20% acrylamide gels (Biorad), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked with Immuno Block (DS Pharma), treated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (streptavidin-HRP, Sigma-Aldrich), and a blot was treated with Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Millipore) and chemical luminescence was detected with a iBright CL 1500 | FL 1500 Imaging Systems (invitrogen). For checking of HaloTag, V5-Tag or Myc-Tag linked protein expression, tagged proteins were visualized by western blotting analysis (details are described-above) using anti-HaloTag pAb (rabbit IgG, promega), anti-V5-Tag pAb (rabbit IgG, proteintech) or MYC-tag rabbit pAb (rabbit IgG, proteintech).

Immunocytochemical study (ICC) of Acriflavine-HaloTag-H2B. Cells were seeded at a density of 8×10^5 cells/mL with media 0.15 mL on the collagen-coated cover glasses in 6 well plate dishes, and incubated for 2 h in CO_2 incubater. After incubation, to the cells was added 1.0 mL of additional medium and incubated for 12 h in CO_2 incubater. To the cells was added acriflavine **71** (from a 10 mM stock solution in DMF, final 1 μM) and incubated for 2 h in CO_2 incubater. The cells were gently washed once in the dish with 1 mL of PBS buffer, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, the cells were washed with PBS buffer once. Nuclei were counterstained with Hoechst33452. Fluorescence signals were observed using a confocal laser microscope (LMS780 spectral confocal system, Zeiss).

Protein purification from photo-irradiated cells. After photo-irradiated (protein-labeled) cells (3.0×10^6 cells) was added 1.0 mL of RIPA buffer (50 mM tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate (SDC), 0.1% SDS, 1% NP-40, supplemented 1 mM DTT, 1000 U/mL Micrococcal nuclease (Takara-bio), 1 mM $CaCl_2$ and EDTA, EGTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Then, the samples were incubated at 4 °C for 15 min, followed by incubation at 37 °C for 10 min. Precipitation was removed by centrifuging (16000 × g, 4 °C, 10 min) to obtain protein extraction. Dynabeads (MyOne StreptAvidin C1, 0.2 mg/sample) was washed with ultrapure water three times and added to protein extraction. After stirring for 4 h at 4 °C, beads were collected by magnetic separation and washed with RIPA buffer (1 mL x 1), wash buffer I (100 mM tris (pH 9.0), 12 mM sodium deoxy cholate (SDC), 12 mM sodium *N*-lauroyl sarcosinate (SLS), 1 mL x 3) wash buffer II (20 mM Tris buffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 M Urea, 1 mL x 3), wash buffer III (20 mM tris buffer (pH 7.5), 1 M NaCl, 1 mL x 3) and 20 mM Tris buffer (pH 8.0, 1 mL x 2). Then, labeled protein binding beads was applied next step (Western-blotting or trypsin digestion for LC-MS/MS).

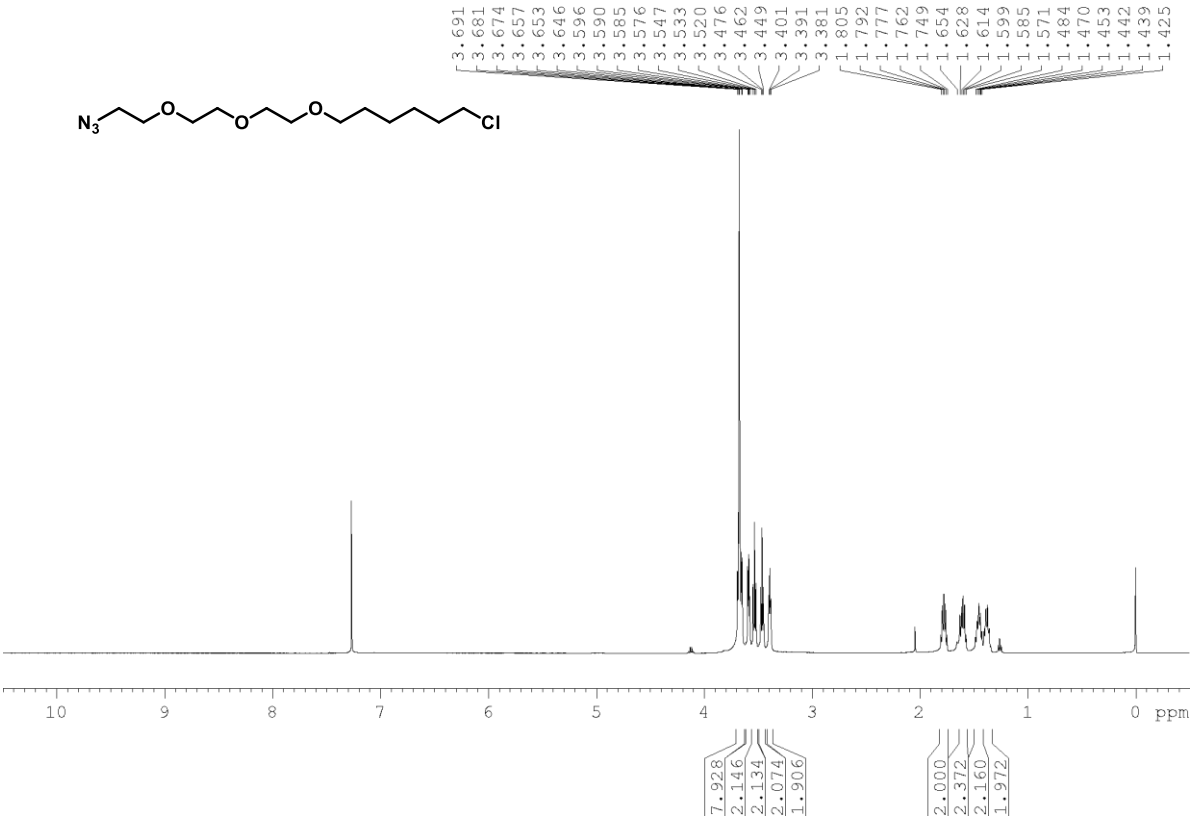
Western-blotting analysis of labeled histone. Desthiobiotin labeled proteins were eluted from beads (prepared in section "Protein purification from photo-irradiated cells") by adding 1 x SDS-PAGE sample buffer supplemented 1 mM biotin (from a 100 mM stock solution in DMSO) and heating at 95 °C for 5 min. The protein mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked with Immuno Block (DS Pharma), treated with anti-H2A (rabbit, Active Motif), anti-H2B (rabbit, Active Motif), anti-H3 (rabbit, Active Motif) or anti-H4 (rabbit, Active Motif) and anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology), a blot was treated with Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Millipore) and chemical luminescence was detected with a iBright CL 1500 | FL 1500 Imaging Systems (invitrogen).

Preparation of digested peptides for nano LC-MS/MS analysis. Desthiobiotin labeled proteins were enriched according to section "Protein purification from photo-irradiated cells". The beads were suspended in 100 μL of 20 mM Tris buffer (pH 8.0) and to the suspension was added trypsin (Promega, final 100 ng/sample). After incubation at 37 °C overnight, to the solution was added 10% TFA solution in ultrapure water (final 0.1% TFA). The solution was desalted using C18 pipette tips (Nikkyo Technos Co., Ltd.). Desalted solution was concentrated under reduced pressure, dissolved in 5% MeCN/0.1% TFA and applied to LC-MS/MS analysis.

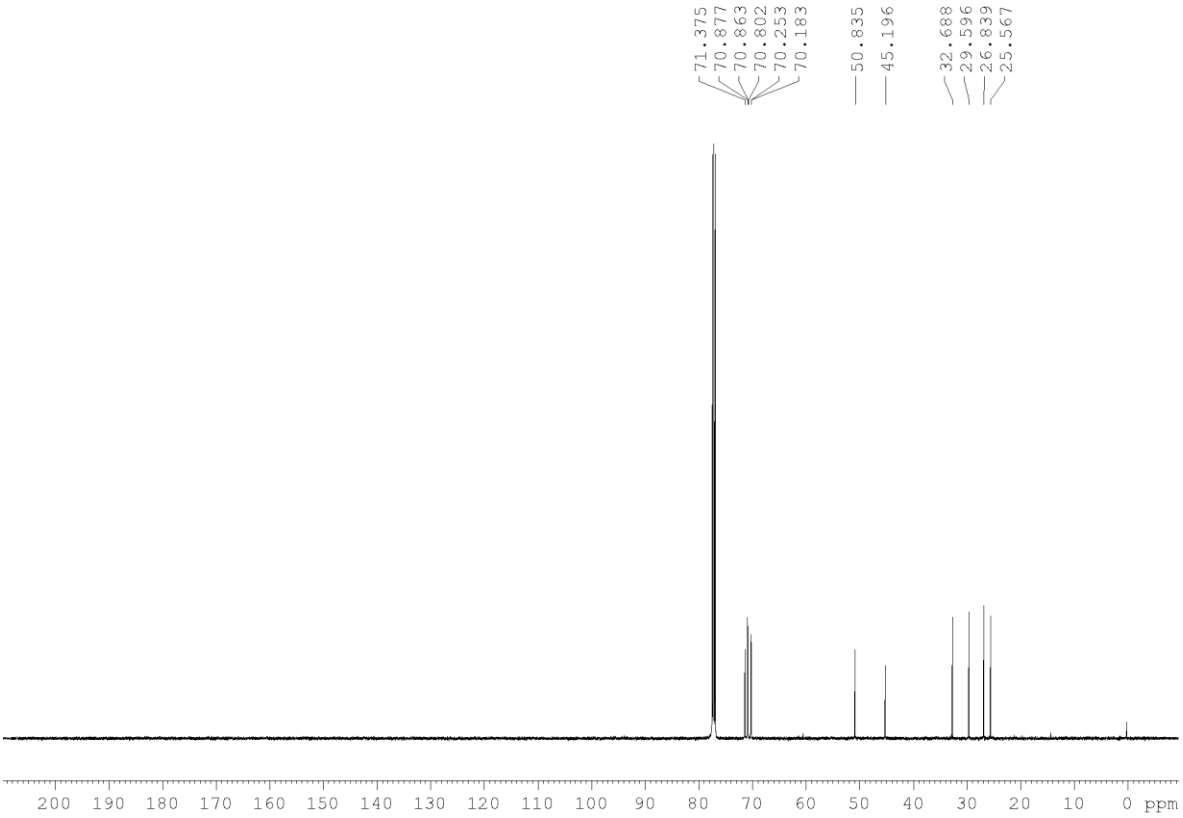
^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds

1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-6-chlorohexane (76).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

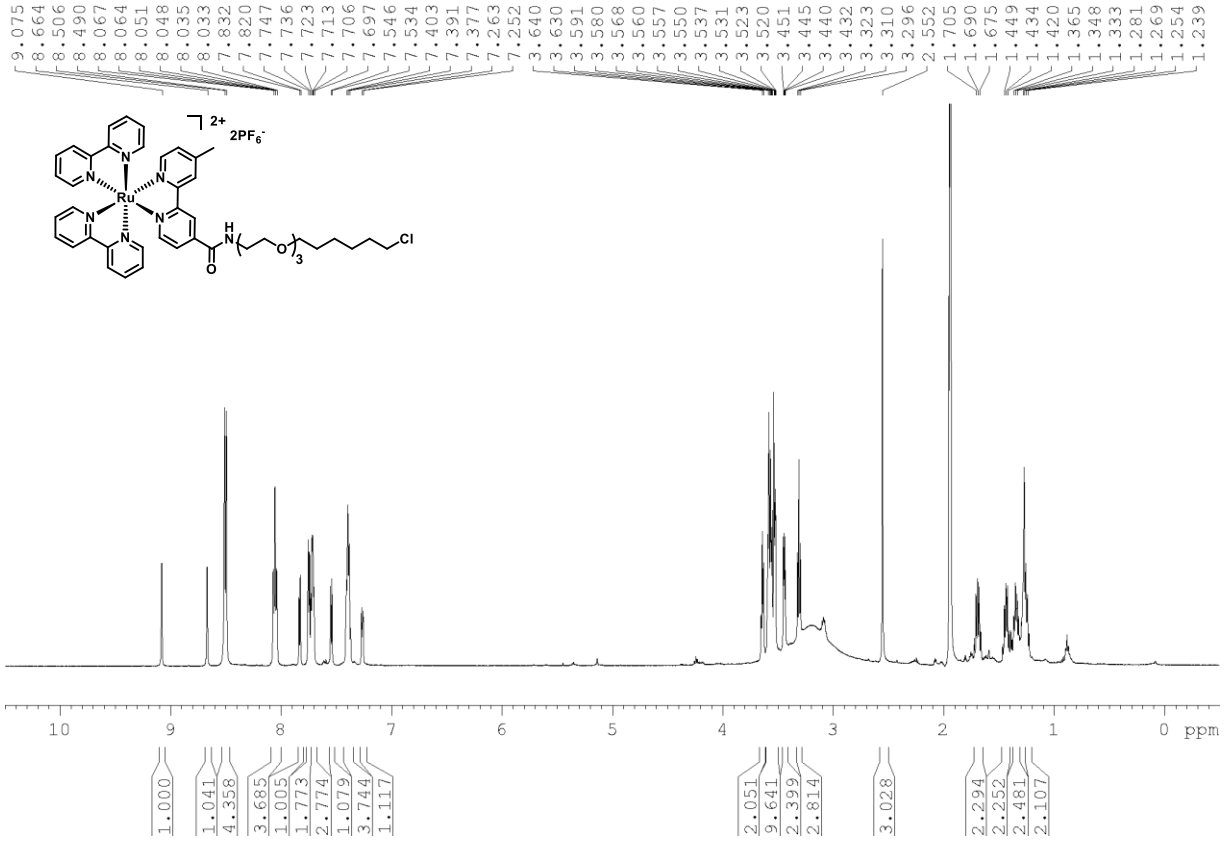


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

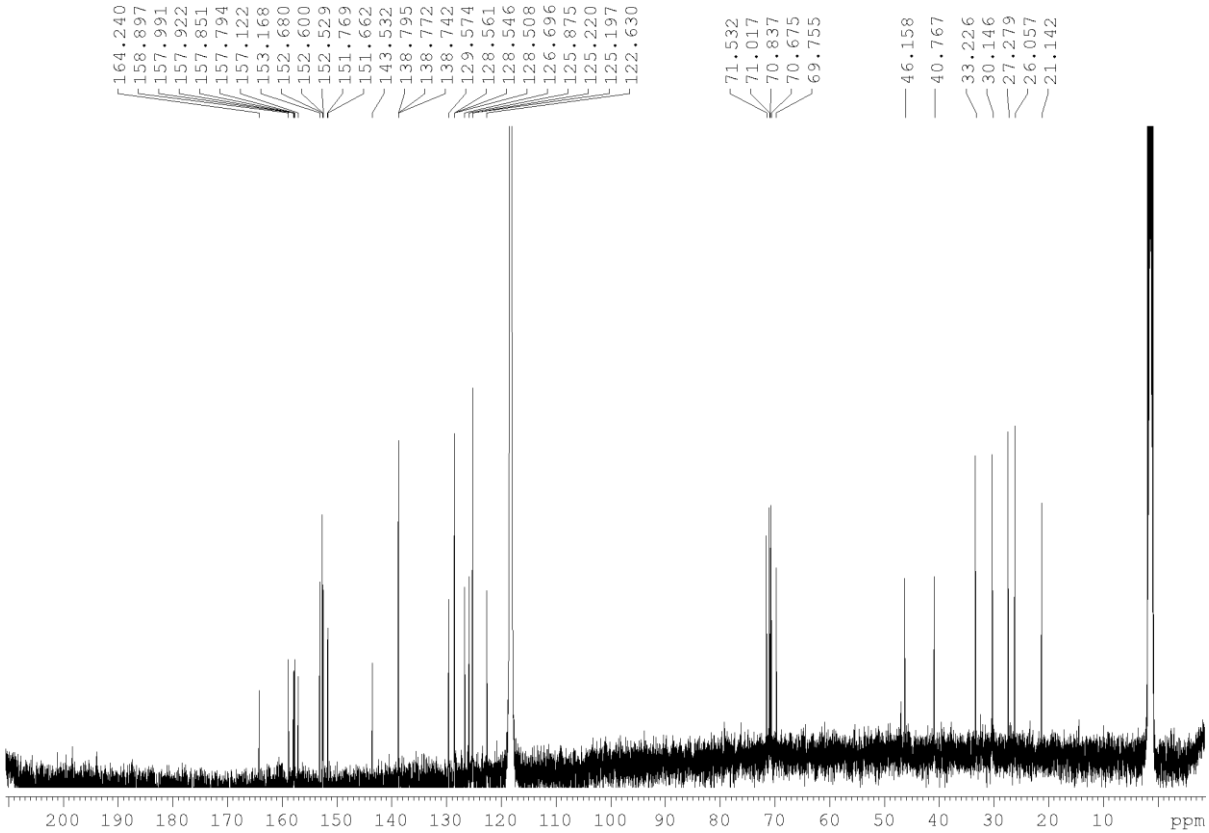


HaloTag ligand conjugated Ru(bpy)$_3$ complex (70)

^{1}H NMR (500 MHz, CD$_3$CN)

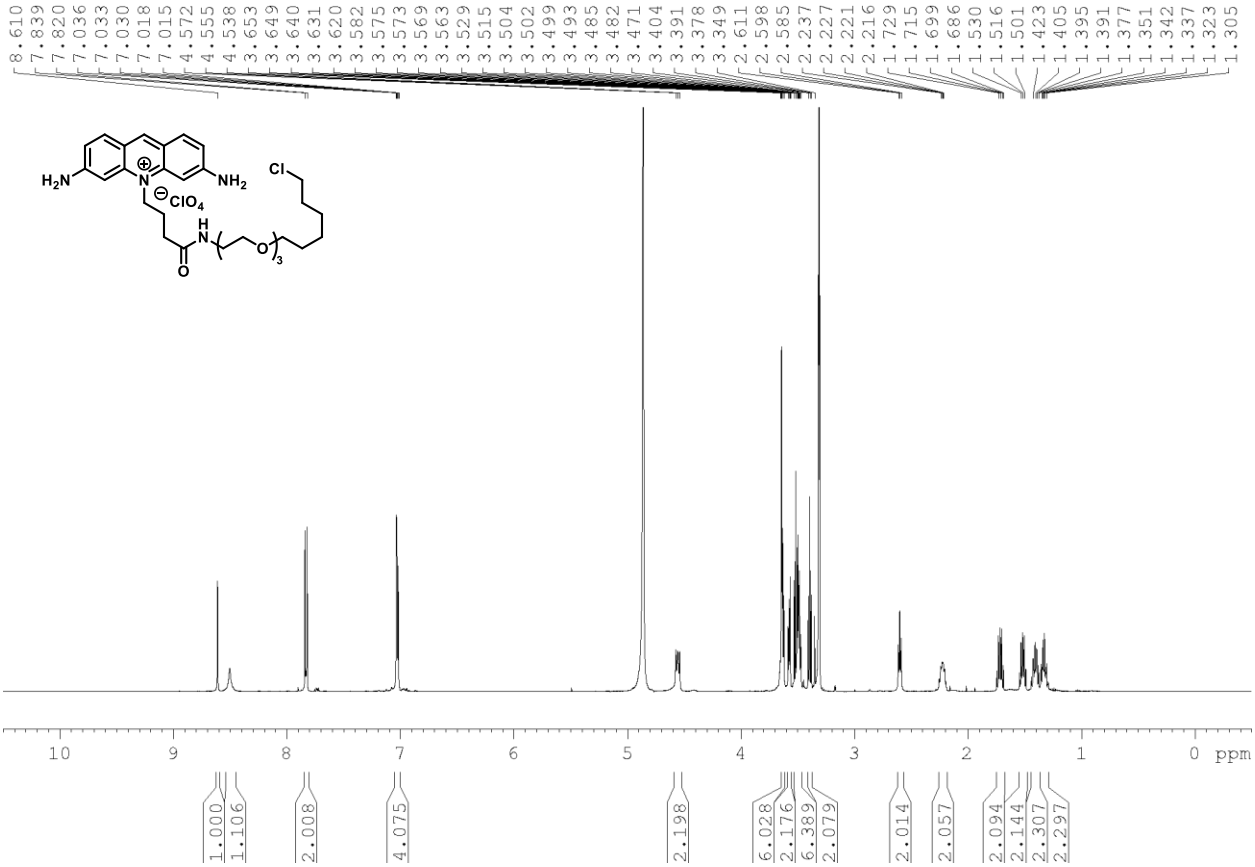


^{13}C NMR (125 MHz, CD$_3$CN)

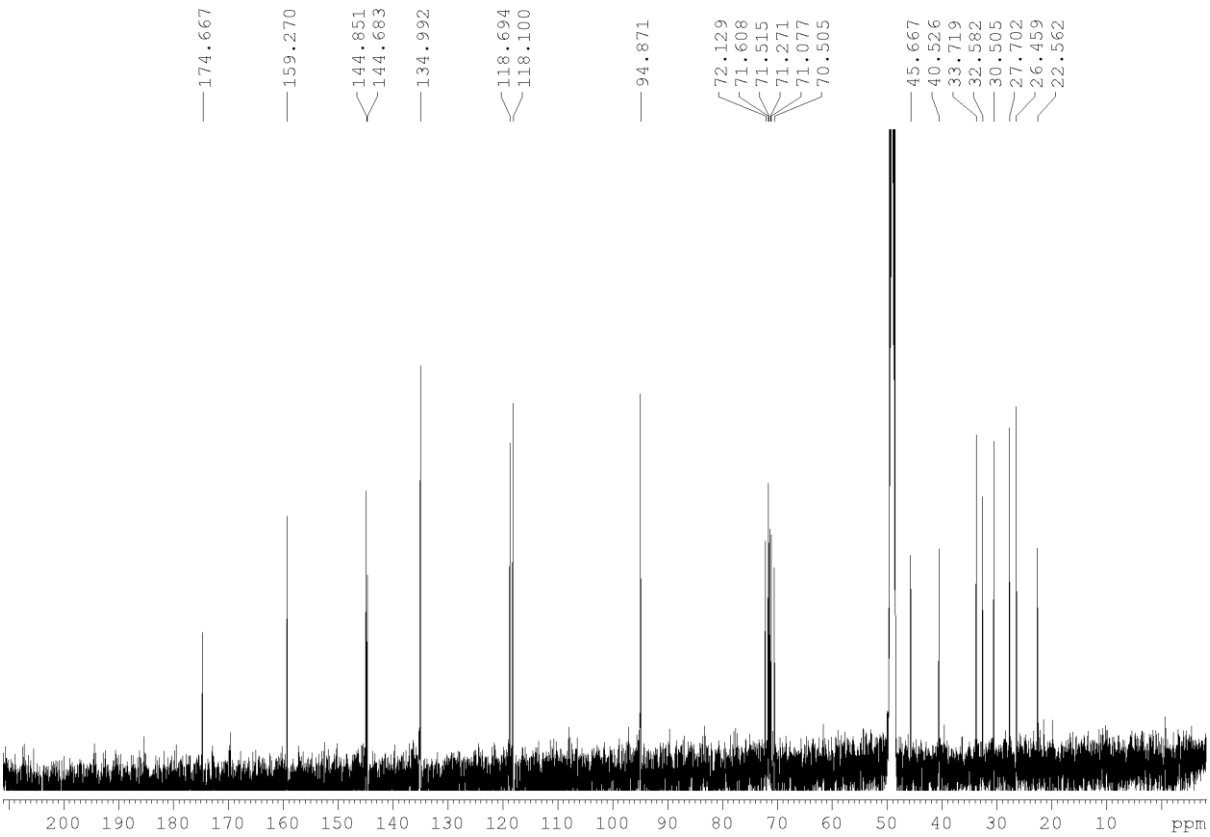


HaloTag ligand conjugated acriflavine (71)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)

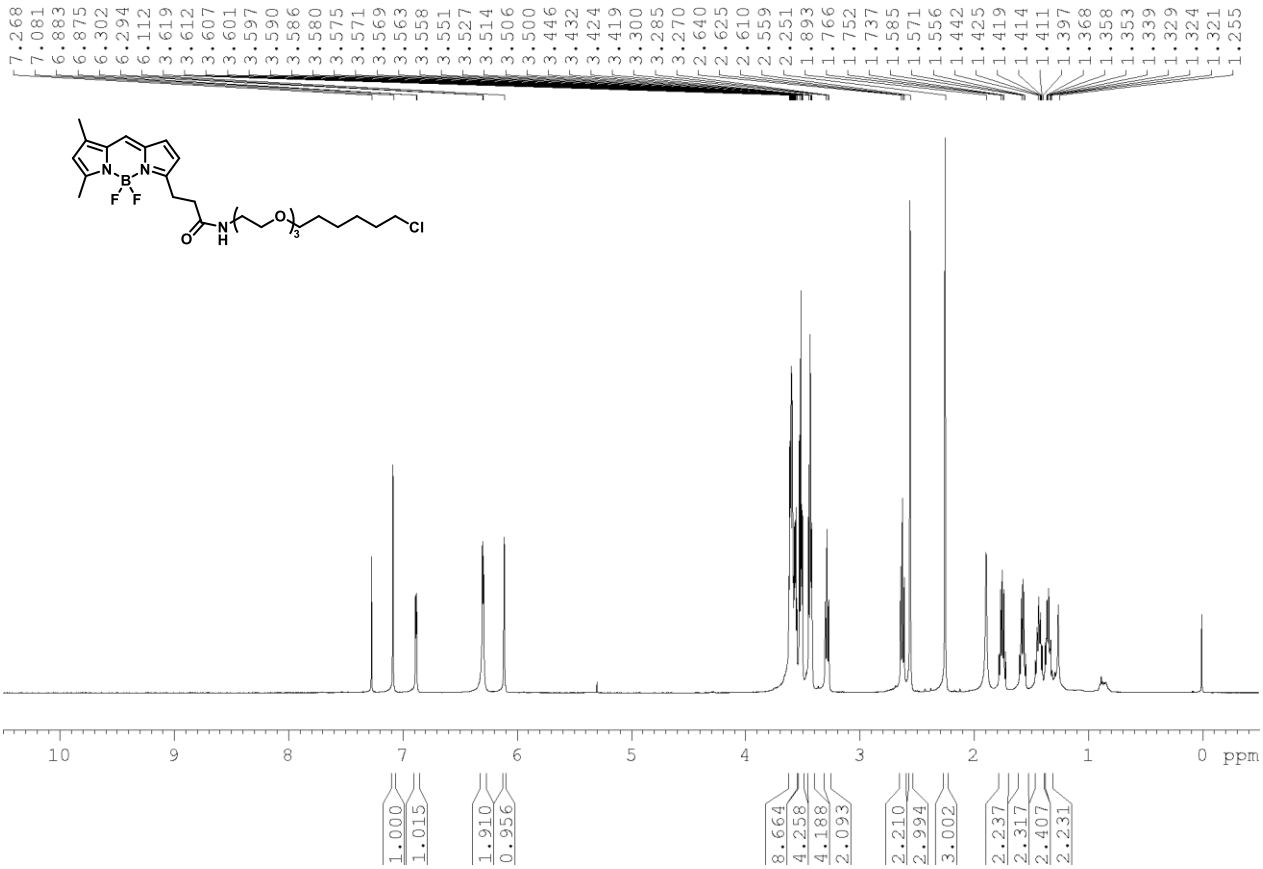


^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)

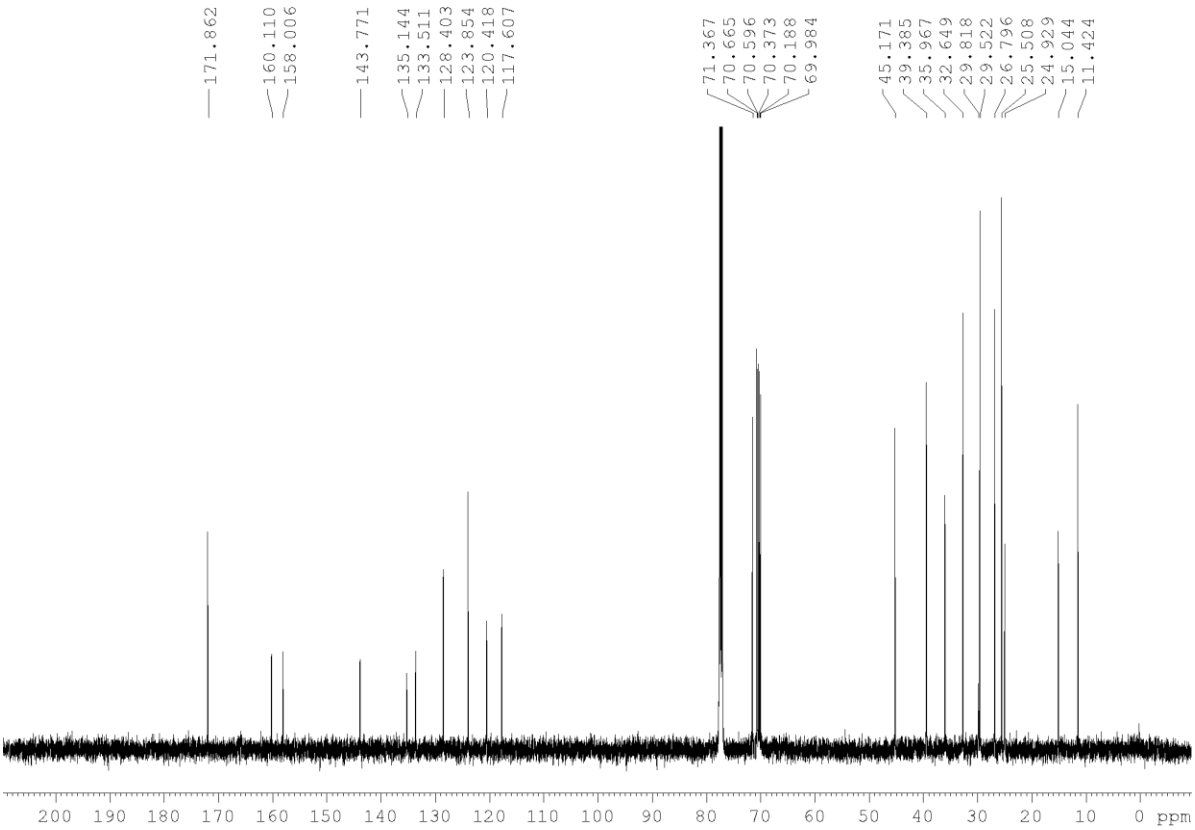


HaloTag ligand conjugated BODIPY (72)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

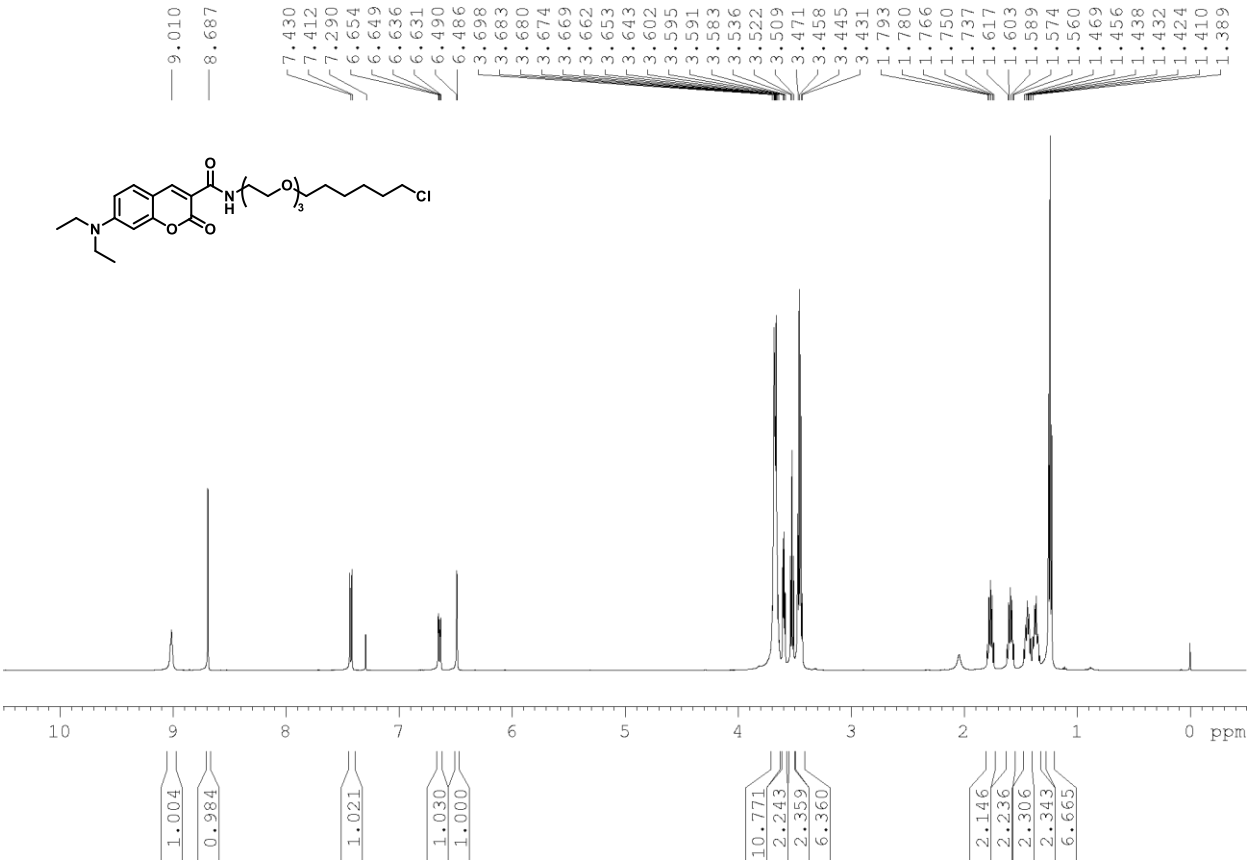


^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

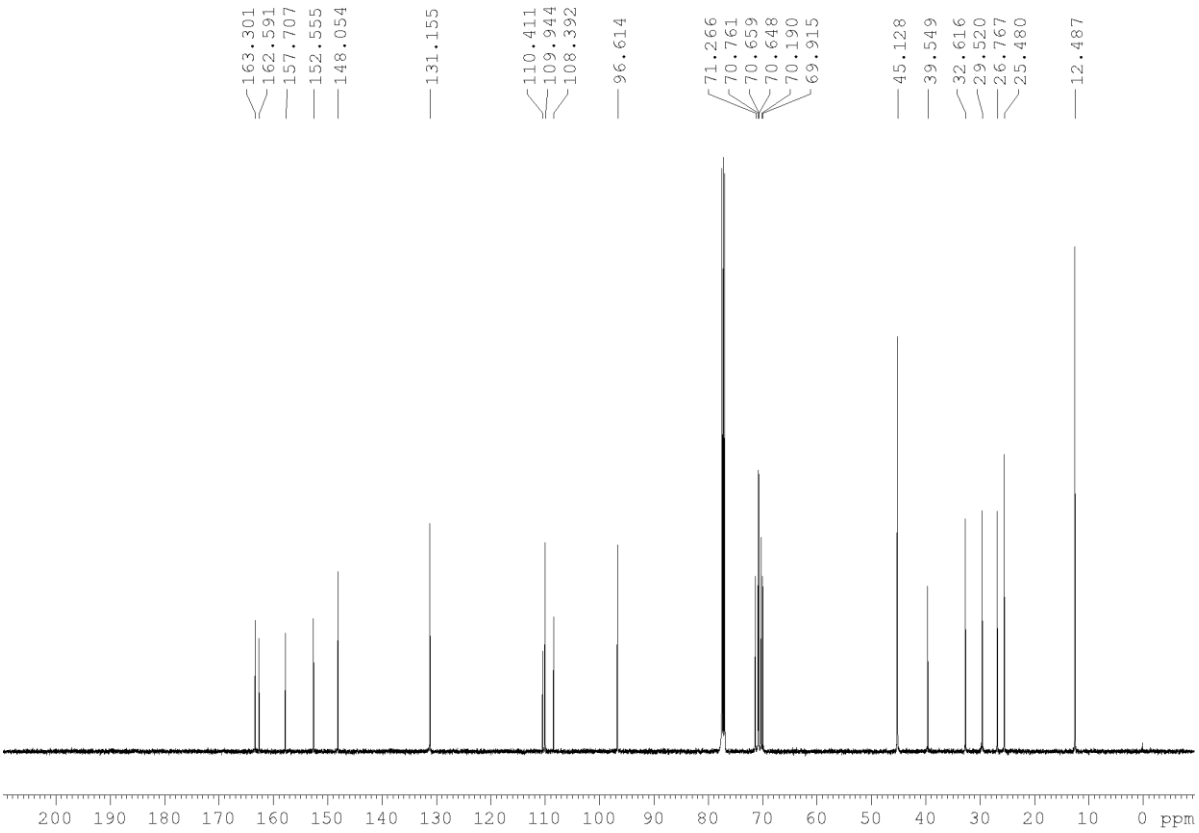


HaloTag ligand conjugated coumarin (73)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)



^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)



第六章

結論

本論文では、光触媒から半径数ナノメートルの局所空間で起こるラジカル反応を活用したタンパク質のラベル化法を基盤とし、リガンド-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用といった生体分子間相互作用解析法を開発した。

第一章「序論」では、近年まで広く用いられる低分子-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用の解析手法ついて述べた。低分子-タンパク質相互作用は相互作用の弱いものを高感度に検出できる手法は少ないこと、タンパク質-タンパク質相互作用は細胞内の解析対象に対して、迅速にかつ細胞への損傷なく、弱い一過性の相互作用を検出する方法がないことを述べ、本研究の意義を明らかとした。

第二章「リガンド結合タンパク質の精製とラベル化を同時に可能とする光触媒担持アフィニティービーズの開発」では、アフィニティービーズ上での標的タンパク質のラベル化を達成するために、本章では、アフィニティービーズ上に担持するための Ru 光触媒誘導体 **1**, **2**, **13** を合成した。しかし、Ru 光触媒 **1**, **2** では Ru のもつ 2+の正電荷に由来する非特異的なタンパク質の吸着を生じた。配位子構造にカルボキシル基を導入した Ru 光触媒 **13** では、カルボキシラートが Ru のもつ電荷を中和することによって非特異的なタンパク質の吸着を抑制し、高純度に標的タンパク質を精製することに成功した。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズを用い、細胞破砕液中の標的タンパク質の精製･ラベル化を行ったところ、一般的な光親和性標識法の反応効率を大きく上回る高いラベル化効率（50%）で精製したタンパク質選択的なラベル化を達成した。Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でラベル化されたタンパク質は酵素活性を保持していた。磁気により回収したビーズを再利用した際、数回程度であればタンパク質精製能･ラベル化触媒機能の失活はみられなかった。本手法で精製・biotin-TRT によりラベル化されたリガンド結合タンパク質は、ストレプトアビジン-HRP を用いた発光検出を用いることで、従来法の銀染色では検出できないほど微量なタンパク質を検出可能にした。

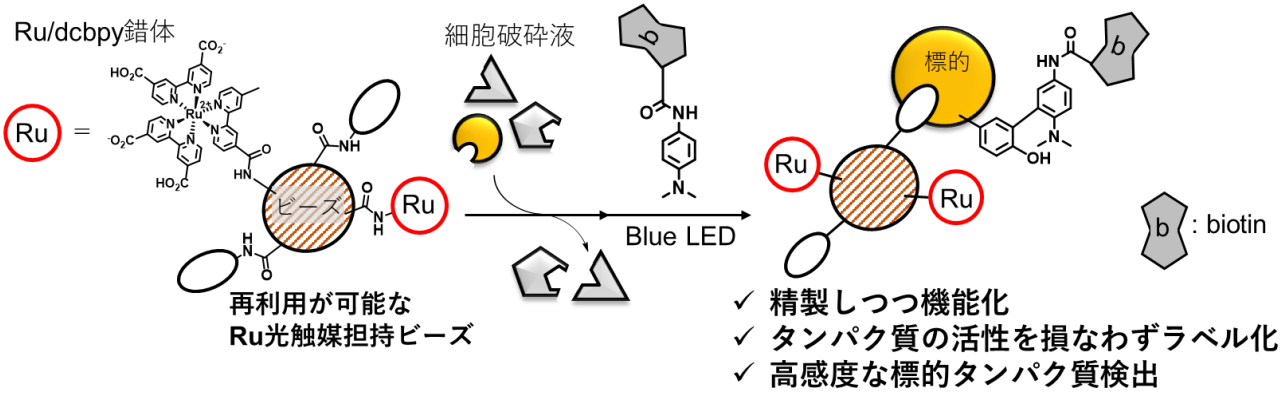


Figure 6-1. 第二章のまとめ

第三章「ラジカル近接ラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) の開発」では Ru 光触媒 **13** 担持アフィニティービーズ上でタンパク質混在系中のリガンド結合タンパク質選択的なラベル化反応を行った。従来までのラベル化剤 TRT では非特異的なラベル化反応が多く進行した。しかし、ラベル

化剤を最適化することで非特異的なラベル化反応を抑え、リガンド結合タンパク質を選択的・高効率にラベル化することができる MAUra を新たなラベル化剤として見出した。アミノ酸のチロシン誘導体との光反応や CV の測定から、MAUra はチロシン残基との反応効率が TRT よりおよそ 5 倍向上しており、ラベル化剤が一電子酸化を受けて生じる活性種が不安定であるため Ru 光触媒から離れた距離に位置するタンパク質への非特異的な反応が抑えられることが示唆された。この Ru 光触媒の半径数 nm 以内で高効率にラベル化することができるという MAUra の特性を活かし、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上でリガンド結合タンパク質を選択的にラベル化することに成功した。

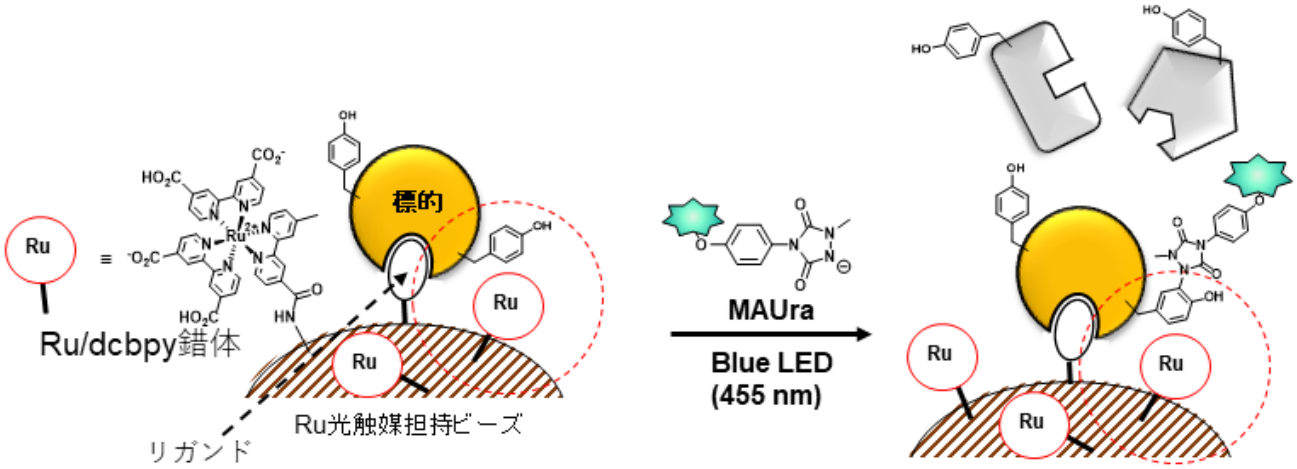


Figure 6-2. 第三章のまとめ

第四章「弱いリガンド–タンパク質相互作用を解析可能にする光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化法の開発」では、第二章で開発した Ru/dcbpy 光触媒担持アフィニティービーズおよび第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を駆使し、リガンドとの相互作用が弱いタンパク質であるレクチンのラベル化・同定を行った。ビーズに担持した糖鎖リガンドは、オリゴマーであるレクチンの複数のリガンド結合ポケットを通じて多価に結合するため、強い相互作用でレクチンを捕捉することが可能であることが予測されたが、実際に本手法によって、一般的なレクチンのラベル化法である光親和性標識法（効率<10%）を上回る効率（22%）でリガンドと相互作用するレクチンを高い選択性でラベル化することに成功した。従来法では検出が困難である細胞内在性レクチンのラベル化を行い、ラベル化タンパク質の nanoLC-MS/MS による解析を行ったところ、細胞に内在する複数のリガンド結合タンパク質を網羅的にラベル化することに成功した。ラクトースをリガンドとしたビーズ上でのラベル化によって細胞内在性の微量のラクトース結合タンパク質である galectin-1 および galectin-3 がラベル化されていることが明らかとなった。さらに、2D-DIGE で検出ができるほどのラベル化効率ではなかったものの、ラクトース結合タンパク質のみならず、galectin-3 との PPI パートナーをラベル化することに成功した。従って、Ru 光触媒担持アフィニティービーズ上で MAUra を用いたラベル化を駆使することによって、従来法では検出が困難な弱いリガンド-タンパク質相互作用や、タンパク質-タンパク質相互作用をラベル化し同定できることを示した。

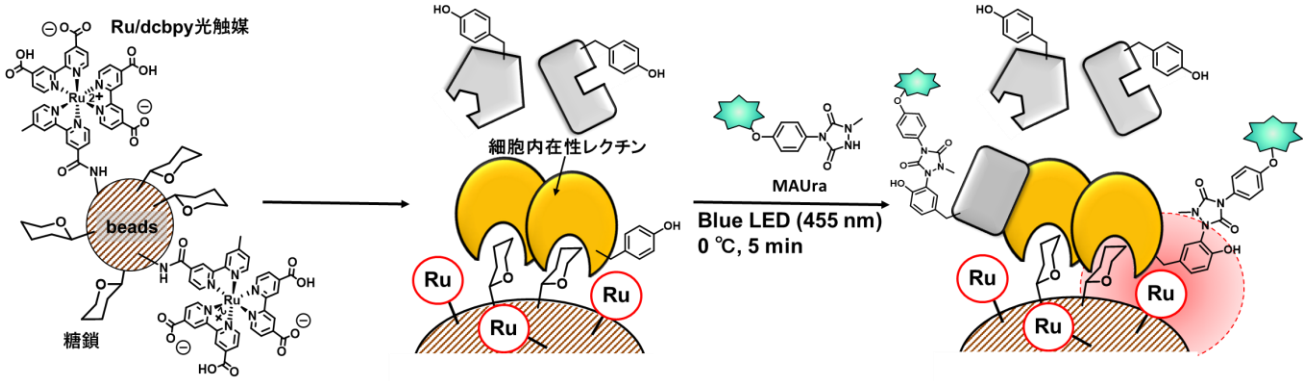


Figure 6-3. 第四章のまとめ

第五章「生細胞内での光触媒近接ラベル化を活用したタンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発」では、第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を用い、POI の相互作用タンパク質の選択的なラベル化を志向した、細胞内光触媒近接ラベル化法 iPPL を確立した。iPPL に最適な細胞膜透過性の高い有機光触媒を光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質ラベル化によってスクリーニングを行った。スクリーニングにおいて、タンパク質吸着性が低く、POI を選択的にラベル化可能な BODIPY、クマリンおよび、高いタンパク質吸着性を有し光触媒担持ビーズ上ではリガンド非依存的なラベル化反応が進行する acriflavine といった光触媒を見出すことに成功した。これらの光触媒に HaloTag リガンドを連結し、細胞膜上の HaloTag-POI に対するモデルの光触媒近接ラベル化を試みたところ、タンパク質吸着性の低い光触媒ではラベル化反応がほとんど進行せず、タンパク質吸着性の高い acriflavine 光触媒によって HaloTag-POI を用いた近接ラベル化が可能になることを見出した。Acriflavine 光触媒を用い、10 nm 程度の直径のタンパク質含有複合体 nucleosome に対して iPPL 法を適用した。H2B を POI とした iPPL 法を実施したところ、細胞内環境においても acriflavine は HaloTag-POI で近接ラベル化反応を可能にすることが明らかとなった。iPPL 法は 1 分間の可視光照射という迅速かつ温和な条件で、従来法（BioID 法、APEX 法）よりも局所的空間で POI および相互作用タンパク質をラベル化できる。BioID のラベル化半径はおよそ 10 nm と言われており、H2B から離れた距離にある H3 関連タンパク質や H4 関連タンパク質、DNA 結合タンパク質もラベル化できる。一方、iPPL 法は H2B の関連タンパク質や H2B と非常に近い距離に存在する H2A の関連タンパク質を選択的にラベル化できることが明らかとなった。本研究で開発した iPPL は、6 nm のラベル化半径もつことから細胞内微小環境における隣接した PPI を高精度に解析できる初めての手法である。

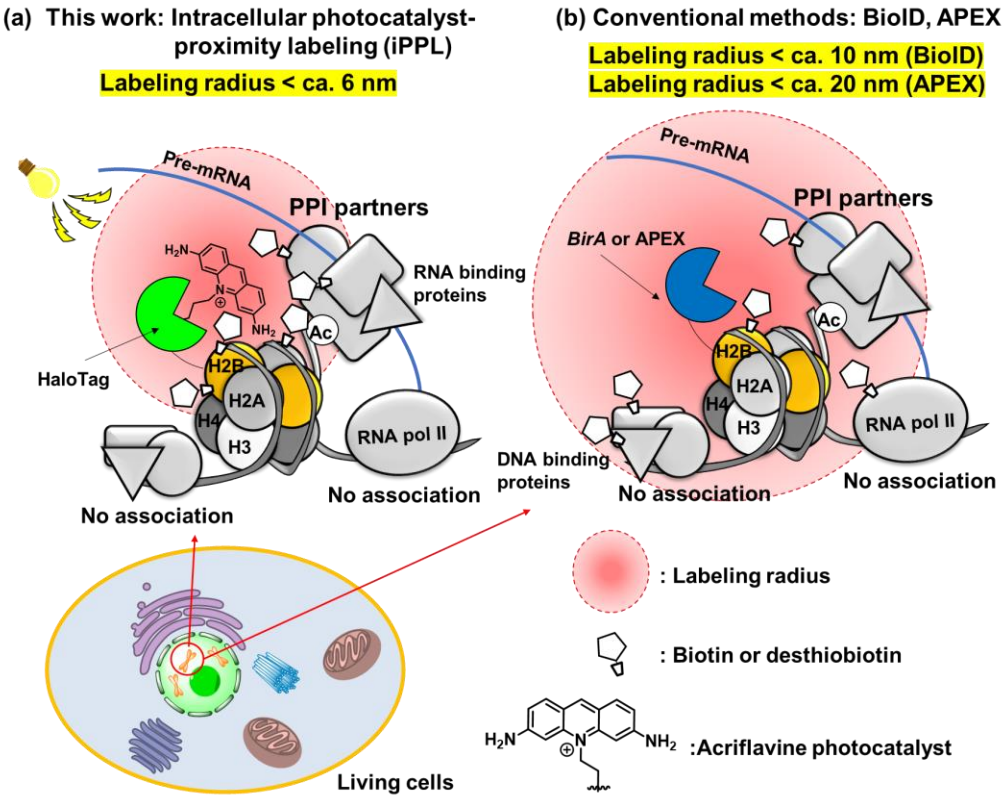


Figure 6-4. 第五章のまとめ