HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低分子生理活性化合物の新規な標的タンパク質同定法の開発
Author(s)	穴吹, 友亮
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13916号
Issue Date	2020-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13916
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/77837
Type	theses (doctoral)
File Information	Tomoaki_anabuki.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低分子生理活性化合物の
新規な標的タンパク質同定法の開発

北海道大学　大学院農学院

共生基盤学専攻　博士後期課程

穴吹　友亮

目次

第 1 章　序論 1

第 1 節　生理活性化合物と標的タンパク質の相互作用検出 1

第 2 節　光アフィニティーラベル化法 3

第 3 節　クリック反応 5

第 4 節　ジャスモン酸生合成経路におけるアレンオキシドシンターゼの役割 6

第 5 節　ジャスモン酸生合成阻害剤としての AOS 阻害剤 8

第 6 節　アブシジン酸（ABA） 10

第 7 節　研究の目的 11

第 2 章　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発 14

第 1 節　目的 14

第 2 節　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の設計 14

第 3 節　光反応基を有するリンカーの合成 16

第 4 節　PpAOS1 に対する阻害剤およびアジドプローブの合成 17

第 1 項　PpAOS1 阻害剤の合成 18

第 2 項　PpAOS1 に対するアジドプローブの合成 18

第 5 節　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性の検証 19

第 1 項　PpAOS1 の検出 19

第 2 項　化学発光シグナルに対する PpAOS1 の濃度依存性 20

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **24** の濃度依存性 21

第 4 項　アジドプローブ **24** の有効性の確認 21

第 5 項　大腸菌粗酵素液中の PpAOS1 の検出 22

第 3 章　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発 24

第 1 節　目的 24

第 2 節　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の設計 24

第 3 節　アミノ基を有するリンカーの合成 26

第 4 節　AtPYL2 に対するアジドプローブの合成 27
第 5 節　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性の検証 27
第 1 項　AtPYL2 の検出 27
第 2 項　化学発光シグナルに対する AtPYL2 の濃度依存性 28
第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性 29
第 4 項　アジドプローブ **33** の有効性の確認 29
第 5 項　大腸菌粗酵素液中の AtPYL2 の検出 30
第 6 節　クロスリンクの方法が異なる 2 つの標的タンパク質同定法の比較 31
第 1 項　AtPYL2 検出における検出感度の比較 31
第 2 項　PpAOS1 検出における検出感度の比較 32

第 4 章　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の開発 33
第 1 節　目的 33
第 2 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の設計 33
第 3 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の有効性の検証 35
第 1 項　タンパク質粗抽出液からの AtPYL2 の精製 35
第 2 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の濃度依存性 37
第 3 項　AtPYL2 精製における DTSSP の濃度依存性 38
第 4 項　AtPYL2 精製におけるタンパク質粗抽出液の濃度依存性 39
第 5 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の有効性の検証 40

第 5 章　シロイヌナズナの未報告のアブシジン酸結合タンパク質の同定 42
第 1 節　目的 42
第 2 節　シロイヌナズナ由来のタンパク質粗抽出液からのアブシジン酸結合タンパク質の精製 42
第 3 節　アブシジン酸結合タンパク質のアミノ酸配列解析 43
第 4 節　大腸菌を用いた組換え AtTRXh3 の作製 44
第 5 節　ABA と組換え AtTRXh3 の結合解析 44

第 6 章　総論 46

第 7 章　実験部 50
第 1 節　化合物の合成 50
第 1 項　使用した機器および担体 50
第 2 項　合成 51
第 2 節　生化学実験における基本操作 63
第 1 項　使用した機器 63
第 2 項　タンパク質濃度の測定 63
第 3 項　SDS-PAGE 64
第 4 項　CBB 染色 64
第 5 項　銀染色 64
第 3 節　遺伝子実験における基本操作 64
第 1 項　使用した機器 64
第 2 項　大腸菌用培地組成 65
第 3 項　アガロースゲル電気泳動 65
第 4 項　アガロースゲルからの DNA 抽出 65
第 5 項　制限酵素処理 65
第 6 項　ライゲーション反応 66
第 7 項　In-Fusion クローニング 66
第 8 項　大腸菌コンピテントセルの作製 66
第 9 項　大腸菌の形質転換 67
第 10 項　コロニーPCR 67
第 11 項　プラスミド抽出 68
第 12 項　塩基配列解析 69
第 4 節　組換えタンパク質の発現 69
第 1 項　使用した機器 69
第 2 項　組換え AtPYL2 の作製 70
第 3 項　組換え PpAOS1 の作製 70
第 4 項　組換え PpAOC2 の作製 71

第 5 項　組換え AtTRXh3 の作製 71
第 6 項　使用したプライマーの配列 74
第 5 節　PpAOS1 のアフィニティーラベル化 74
第 1 項　リンカー**1** を用いる手法（光反応基を用いる手法） 74
第 2 項　化学発光シグナルに対する PpAOS1 の濃度依存性 75
第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **24** の濃度依存性 75
第 4 項　アジドプローブ **24** の有効性の確認 75
第 5 項　大腸菌粗酵素液中の PpAOS1 の検出 76
第 6 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法） 76
第 6 節　AtPYL2 のアフィニティーラベル化 76
第 1 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法） 76
第 2 項　化学発光シグナルに対する AtPYL2 の濃度依存性 77
第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性 77
第 4 項　アジドプローブ **33** の有効性の確認 77
第 5 項　大腸菌粗酵素液中の AtPYL2 の検出 78
第 6 項　リンカー**1** を用いる手法（光反応基を用いる手法） 78
第 7 節　AtTRXh3 のアフィニティーラベル化 78
第 1 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法） 78
第 2 項　過剰量の ABA を添加した場合 79
第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性 79
第 8 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を利用した標的タンパク質の精製 79
第 1 項　大腸菌粗酵素液中からの AtPYL2 の精製 79
第 2 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の濃度依存性 80
第 3 項　AtPYL2 精製における DTSSP の濃度依存性 80
第 4 項　AtPYL2 精製におけるタンパク質粗抽出液の濃度依存性 80
第 5 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の有効性の検証 80
第 6 項　シロイヌナズナ由来のタンパク質粗抽出液からのアブシジン酸結合タンパク質の精製 81
第 9 節　ウェスタンブロッティング 81
第 1 項　使用した機器 81

第 2 項　SDS-PAGE 電気泳動 82
第 3 項　ブロッティング 82
第 4 項　ブロッキング 82
第 5 項　膜上での反応 83
第 6 項　検出 83
第 10 節　プロテオーム解析 84
第 1 項　AtPYL2 の同定におけるペプチド溶液の調製 84
第 2 項　シロイヌナズナの ABA 結合タンパク質の同定におけるペプチド溶液の調製 84
第 3 項　ペプチド断片の検出 85

略語一覧 86

参考文献 89

謝辞 96

第 1 章　序論

第 1 節　生理活性化合物と標的タンパク質の相互作用検出

ポストゲノム研究において、様々な生命現象を司る低分子生理活性化合物（以下生理活性化合物とする）の機能解明は最も重要な課題の一つである。これまで、遺伝子およびタンパク質の機能解析に関する研究手法としては、PCR 等の遺伝子解析技術および MALDI-Tof をはじめとする新たな質量分析法が開発され、飛躍的な発展を遂げている。生理活性化合物は、受容体や酵素等のタンパク質に作用することで生理作用を示す。したがって、生理活性化合物の標的タンパク質の同定は、生理活性化合物の詳細な機能解析の第一歩であり、極めて重要である。生理活性化合物の機能がどのようなタンパク質を介して発現するのかを解析する手段として、生体（細胞や生物個体）に生理活性化合物を作用させた時に現れる様々な生物学的変化を生化学的または分子生物学的手法により解析することで標的タンパク質を同定する方法と、生理活性化合物と標的タンパク質の物理化学的相互作用を直接検出する方法が挙げられる（図 1)。

生理活性化合物と標的タンパク質の相互作用を直接的に検出するためには、化合物を化学修飾（bio-conjugation）する必要がある [1)]。一般的には、標識化のための検出用官能基を導入したプローブを合成するという手法が用いられている。検出用官能基には、アガロースやビニルポリマーなどの樹脂に生理活性化合物を直接固定化するための官能基 [2)]や、ストレプトアビジンと強固に相互作用するビオチンが頻繁に用いられている [3-5)]。検出用官能基を導入したプローブの合成には、末端アルキンとアジド化合物の環化付加反応を利用した反応 [6)]により、生理活性化合物に対して様々な官能基の部分構造を導入する方法が用いられるようになってきている。

合成されたプローブをタンパク質粗抽出液に混合させ、多くの夾雑物が存在する中で選択的に標的タンパク質と結合させる。生成した複合物は、一般的に質量分析（MS)[7)] により検出される。しかし、MS の検出感度が近年向上してきているものの、生理活性化合物と標的タンパク質の結合は分子表面を介した静電気的作用やホスト-ゲスト疎水結合といった非常に微弱なものであるため、複合物の検出は未だに困難である。この欠点を補うために、生理活性化合物と標的タンパク質を共有結合により結合させるアフィニティーラベル化法が開発されている [8-10)]。

アフィニティーラベル化法による生理活性化合物と標的タンパク質の物理化学的相互作用検出において最も重要な事項は、プローブ作製のための構造活性相関に関する知見である。生理活性化合物に存在する官能基の一部は、生理活性の発現に必要である場合が多い。従って、生理活性化合物の活性発現に必要な官能基を化学修飾し固定化や標識化に利用すると、その分子構造を厳密に認識する標的タンパク質との物理化学的相互作用が損なわれる恐れがある。そのため、標的タンパク質との相互作用に重要ではなく修飾可能な官能基を特定するとともに、その官能基を選択的に修飾する合成法を確立する必要がある。この問題を解決するために、Kanoh らは高反応性活性種カルベンを発生する化合物を使って、生理活性化合物の特定の官能基を介さずにランダムに固定化する技術を開発した [11)]。本手法においては、生理活性化合物の様々な部位が固定化に用いられているため、構造活性相関を考慮せずに生理活性化合物と標的タンパク質との結合が可能となる。また、多種類の化合物を同時に固定化することも可能で、生理活性化合物のマイクロアレイおよび [12,13)]、生物活性を有する低分子化合物を固定し分子標的探索用アフィニティー担体 [14,15)]にも応用されている。

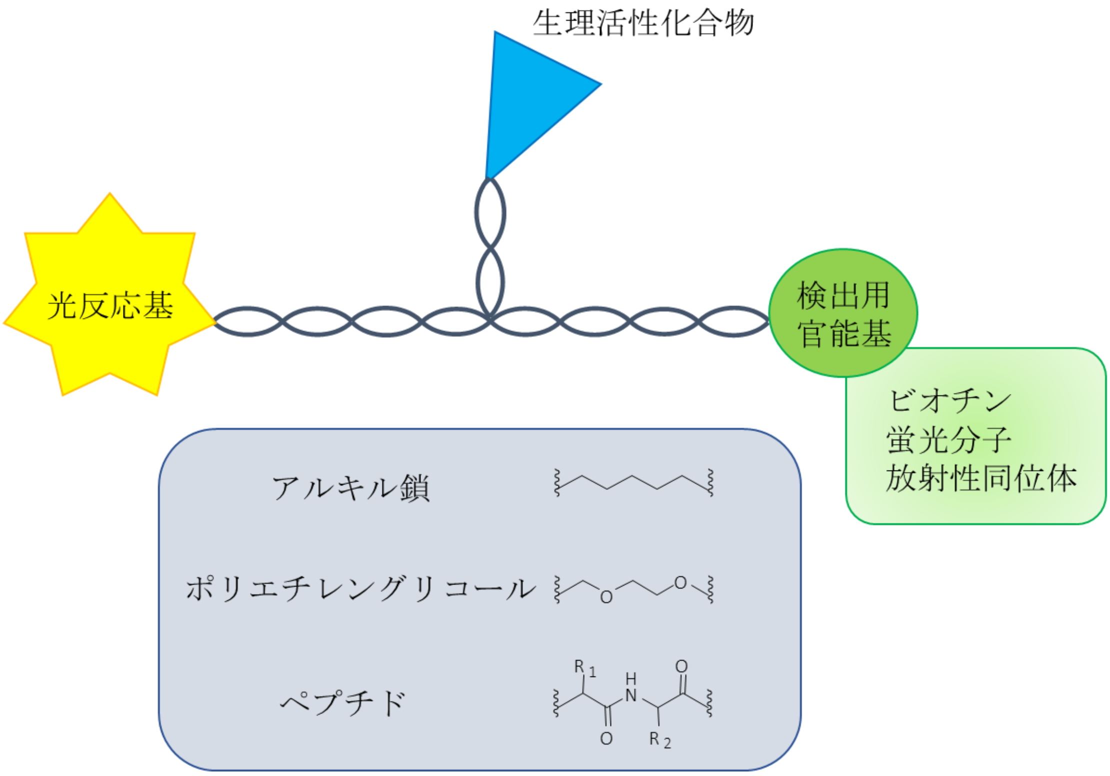


図 1. 低分子生理活性化合物のアフィニティープローブ.

第 2 節　光アフィニティーラベル化法

光アフィニティーラベル化法は、アフィニティーラベル化法の一種であり架橋反応基として光反応基で修飾されたプローブを用いることが特徴として挙げられる [16]。光アフィニティープローブは、生理活性化合物に光反応基と検出用官能基を導入した誘導体であり、標的タンパク質に対する特異的親和性を保持していることが必要である。光反応基として主にフェニルアジド、ベンゾフェノンおよびフェニルジアジリンが用いられ（図 2）[17]、いずれも特定の波長の光を照射することにより励起され、空間的に隣接しているタンパク質と共有結合を形成する。その後、それぞれの検出用官能基に最適な検出法により光アフィニティーラベルプローブと標的タンパク質複合体を検出することで、タンパク質粗抽出液中より標的タンパク質を特定することが可能である（図 3）。光アフィニティーラベル化法において汎用されている光反応基の中では、比較的長波長の紫外線で速やかに反応し、安定な架橋を形成するジアジリンを用いた研究例が多い [18]。検出用官能基としてはビオチンが多く用いられており、ビオチンが結合しているジアジリン誘導体が報告されている [19]。

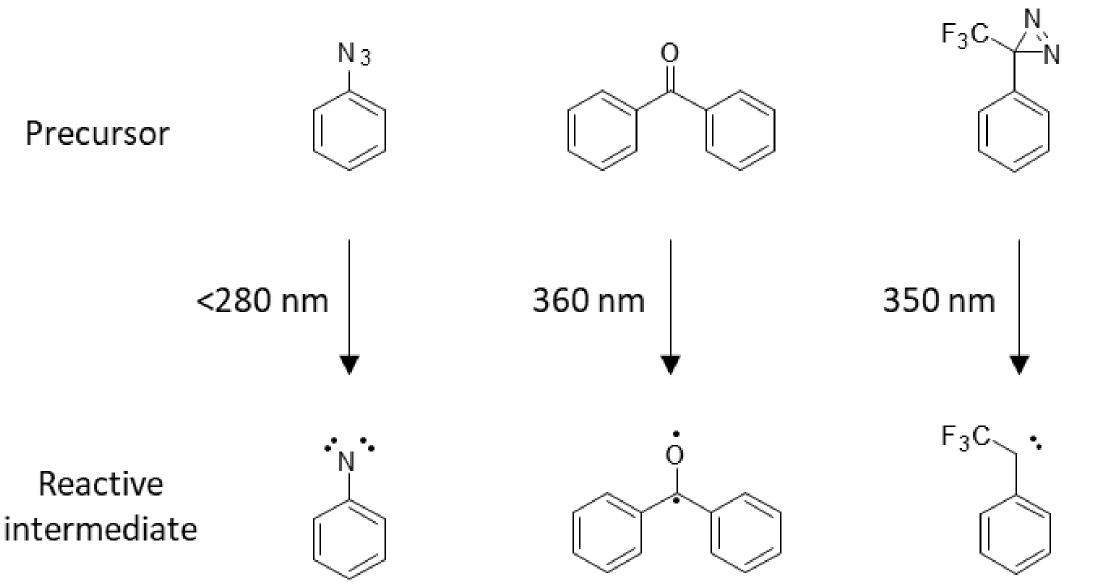


図 2. 光反応基とその活性化学種.

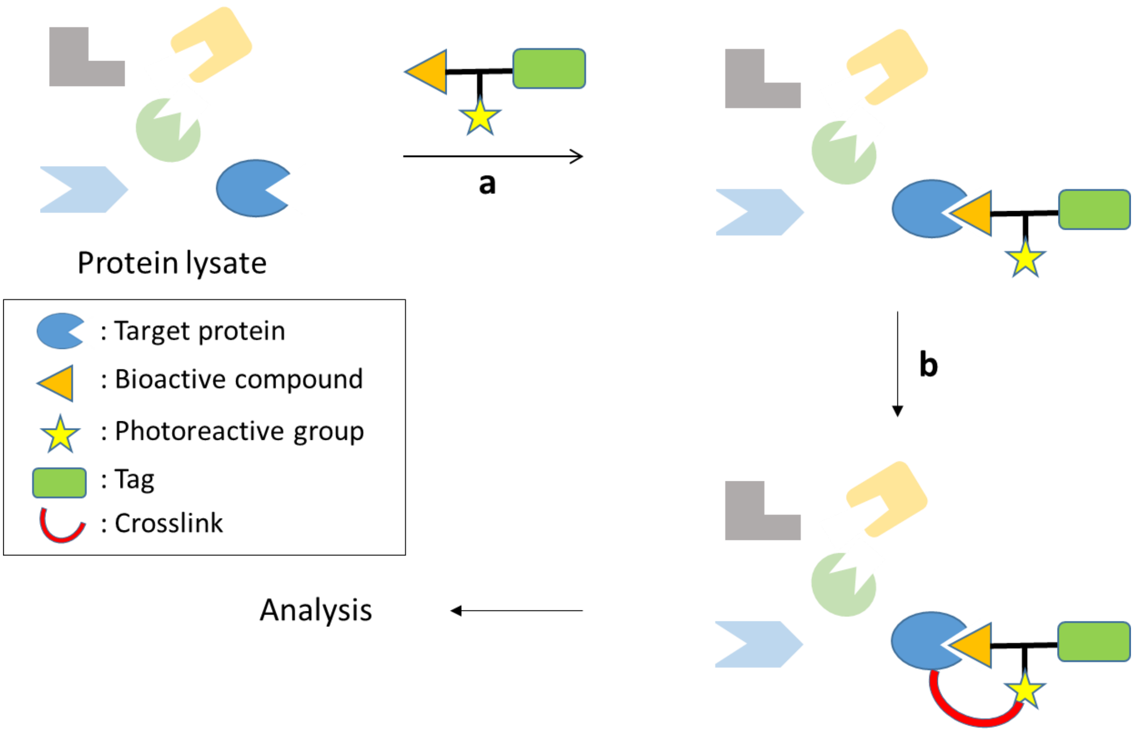


図 3. 光アフィニティーラベル化法.

a) 光アフィニティープローブとタンパク質溶液の混合; b) クロスリンク反応

プローブ分子中の光反応基は、クロスリンク反応で標的タンパク質と試験化合物との間に安定な共有結合を形成する.

第3節　クリック反応

クリック反応とは、Sharpless が提唱した比較的小型な部分構造同士を結合させる高い反応性、選択性および安定性を有する炭素—ヘテロ原子結合形成反応をいう [20]。クリック反応に用いられる反応の利点として、使用できる官能基の範囲が広いことや、水中を含む温和な条件下で目的生成物を高収率に与えることが挙げられる。また、解析に支障をもたらす副生成物が生じないことも大きな利点である。

クリック反応の代表的な反応として付加環化反応（ヒュスゲン環化付加反応）が挙げられる。本反応では、アルキンとアジドが、無触媒もしくは銅触媒存在下で速やかに 1,2,3-トリアゾール環を形成する（図 4）[21, 22]。ヒュスゲン環化付加反応は現時点においてクリック反応に必要な条件を最も満たしており、クリック反応の代名詞ともなっている。そのため、ヒュスゲン環化付加反応は、有機合成化学分野のみならず生化学、創薬化学から複合ナノ材料分野といった多岐にわたる分野で利用されている。

クリック反応の応用としては、生体分子の化学修飾への展開が注目されている。核酸、糖鎖およびタンパク質等の生体高分子への化学修飾による機能付加は、ケミカルバイオロジー研究に関わるプローブの作製において幅広く応用され [23]、大腸菌の細胞表面のラベル化 [24]並びに細胞内組織の可視化 [25]に成功している。創薬研究への応用例として、Sharpless らは、弱いアセチルコリンエステラーゼ（AchE）阻害活性を有する全く異なる二つのフラグメントを Target-guided synthesis (TGS)[26, 27] のコンセプトの下、*In situ* クリック反応で結合させ強力な AchE 阻害剤の合成に成功した [28]。

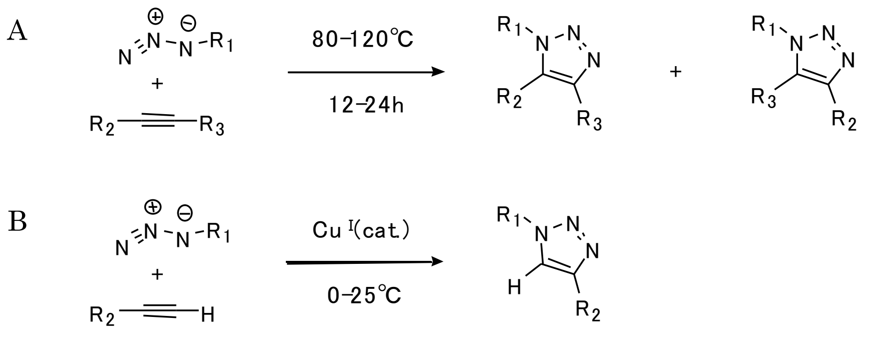


図 4. アジドとアルキンによるヒュスゲン環化付加反応.

A: 触媒非存在下 B: 銅触媒存在下

第 4 節　ジャスモン酸生合成経路におけるアレンオキシドシンターゼの役割

ジャスモン酸は植物ホルモンの一種であり、植物におけるストレス応答、成長阻害、老化促進および傷害抵抗性に深く関与している [29,30]。ジャスモン酸の生合成経路はオクタデカノイド経路と呼ばれる（図 5）[31]。オクタデカノイド経路中の酵素の一種である、アレンオキシドシンターゼ（AOS）は、13(*S*)-hydroperoxy-(9*Z*,11*E*,15*Z*)-octadecatrienoic acid（13-HPOT）を、12,13(*S*)-epoxy-(9*Z*,11*E*,15*Z*)-octadecatrienoic acid（12,13-EOT）とする酸化反応を触媒する。*AOS* 遺伝子はシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）[32]やトマト（*Lycopersicon esculentum*）[33]などからクローニングされ、その詳細な機能解析がなされている。また、当研究室の Bandara らは、蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）より *PpAOS1* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた組み換え PpAOS1 が AOS 活性を有することを明らかにした [34]。

AOS はシトクロム P450 酵素であるが、他のシトクロム P450 酵素と異なり CO に対する結合が弱く、NADPH 還元酵素や酸素を反応に必要としない [35]。そのかわり、AOS は過酸化基質の酸素原子を酸素供与体として用いる。シトクロム P450 酵素は分子内に疎水性の基質分子を受け入れる空間があり、酸素分子を活性化するヘムがその基底に位置している。

13-HPOT にはヒドロペルオキシ基が存在し、これが AOS の活性中心に存在する Fe(Ⅲ) と相互作用することで、AOS Fe(Ⅲ) から 13-HPOT の O-O 結合に 1 電子が遷移する。その結果、AOS Fe(Ⅳ)-OH とアルコキシラジカル基質が形成され、フリーラジカル酸化と β-プロトンの減少により不安定な酸化物が生成される。AOS は 13-HPOT の脂溶性部分と結合することで、基質を認識すると同時に、ヒドロペルオキシ部分は補欠分子ヘムと十分に相互作用可能となる（図 6）[36]。

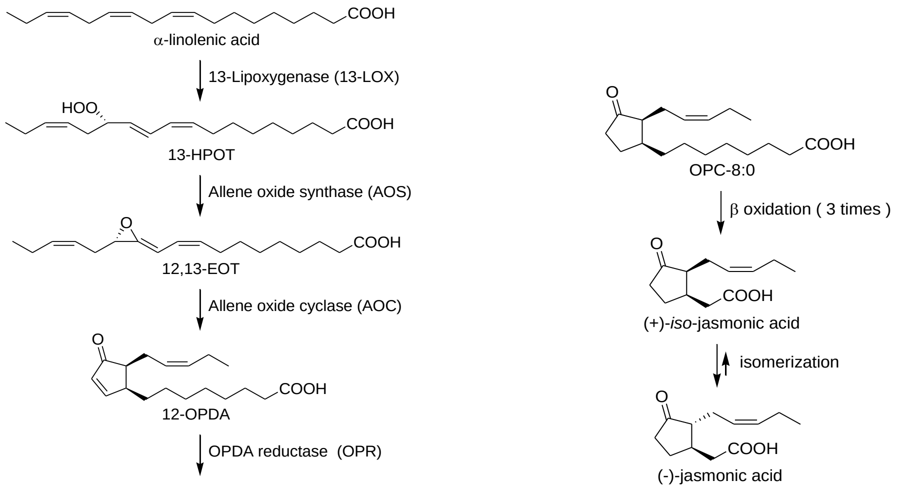


図 5. オクタデカノイド経路.

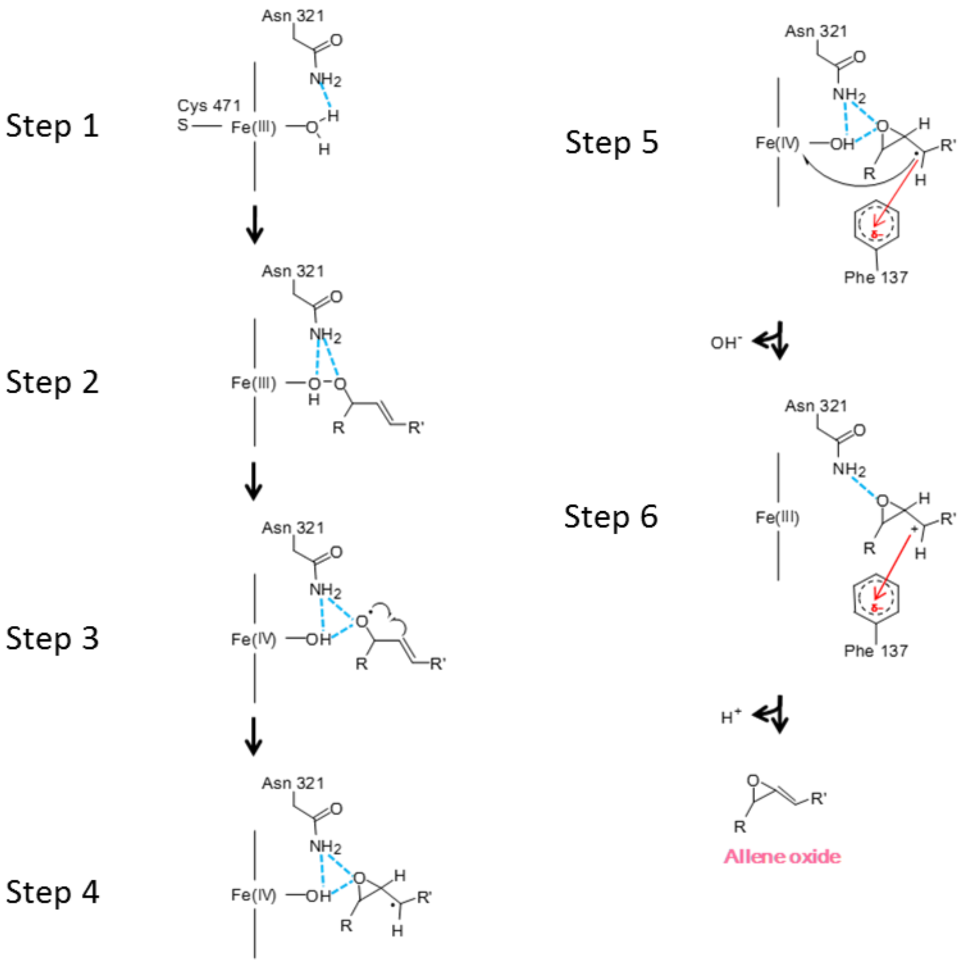
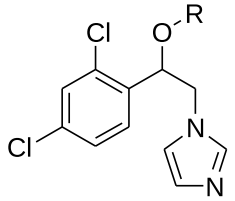


図 6. AOS の推定反応様式 36).

第 5 節　ジャスモン酸生合成阻害剤としての AOS 阻害剤

ジャスモン酸生合成経路において、AOS による 13-HPOT の代謝は最初の特異的な反応であり、そのためにジャスモン酸の生合成を制御するうえで非常に重要である。また、シトクロム P450 の阻害機構は詳細に研究されており [37]、イミダゾール誘導体の多くがシトクロム P450 に対して阻害活性があることが報告されている [38]。これは、イミダゾール環がタンパク質の脂溶性部位に結合するだけでなく、同時に補欠分子ヘムにも強く結合するためである [39]。この性質を利用して、Oh らは AOS 阻害剤の開発を目的とし、1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol を基本骨格に、アルキル基を基本として様々な置換基を導入した化合物群を合成した [40]。*A. thaliana* 由来の組み換え AtAOS2 の阻害活性を指標としてこれらの阻害剤としての有用性を検討したところ、これまで AOS 阻害活性が報告されているシトクロム P450 阻害剤である acetylsalicyclic acid[41] や ketoconazole[42] より強い阻害剤を創出することに成功すると同時に、置換基 R に関する構造活性相関の知見を得ている (表 1)。表 1 に示した通り、アルケニル基、直鎖アルキル基およびアルキルカルボン酸エステル基を導入した化合物の AOS 阻害活性を比較すると、アルキルカルボン酸エステル基、直鎖アルキル基、アルケニル基の順に阻害活性が強いことが示された。さらに、アルキルカルボン酸エステル基の末端の炭素数を増加させることにより、AOS 阻害活性が増加する傾向にあることも判明した。Oh らは合成した化合物の中で最も強い AOS 阻害活性を示した化合物 k について、AOS の拮抗型阻害剤であることを示した [43]。また、光学活性な化合物 k を合成することに成功し、*S* 体に比べ *R* 体がより高い AOS 結合活性を示すことを明らかにした [44]。

表 1. 合成化合物と既知 P450 阻害剤の AOS 阻害活性 [40].

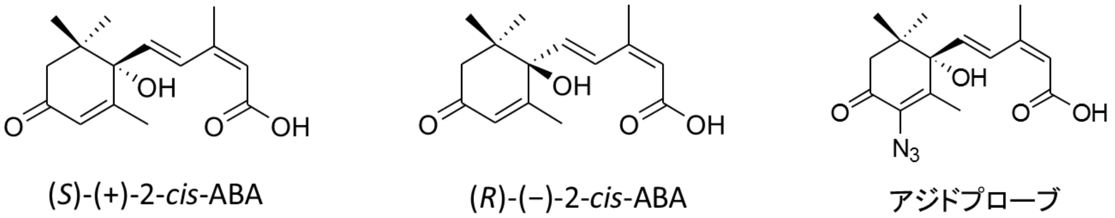


compound	R	IC_{50} (μM)
a	$CH_2CH{=}CH_2$	8.8±2.2
b	$CH_2CH{=}C(CH_3)_2$	5.9±3.2
c	$CH_2(CH_2)_7CH_3$	0.61±0.2
d	$CH_2(CH_2)_2CH_3$	0.90±0.3
e	$CH_2(CH_2)_3COOCH_2CH_3$	1.0±0.6
f	$CH_2(CH_2)_4COOCH_2CH_3$	0.67±0.2
g	$CH_2(CH_2)_6CH_3$	0.85±0.3
h	$CH_2(CH_2)_6COO(CH_2)_2CH_3$	0.21±0.6
i	$CH_2(CH_2)_6COO(CH_2)_3CH_3$	0.12±0.02
j	$CH_2(CH_2)_6COOCH_2CH(CH_3)_2$	0.08±0.022
k	$CH_2(CH_2)_6COO(CH_2)_6CH_3$	0.01±0.005
Acetylsalicyclic acid		2500±50
Ketoconazole		10,000±150

第 6 節　アブシジン酸（ABA）

ABA は植物ホルモンの一種であり、その代表的な生理作用として、気孔の閉鎖、乾燥耐性の獲得、種子成熟および休眠などが挙げられる[45-47]。なお、天然型の ABA は(*S*)-(+)-2-*cis*-ABA であり、光学異性体の(*R*)-(−)-2-*cis*-ABA は天然には存在しない（図 7）[48]。また、Todoroki らにより、ABA の 6 員環構造にアジド基を導入した化合物が ABA と同様の活性を有し、アジドプローブとして利用可能であることが既に報告されている[49]。

ABA のシグナル伝達については多くの研究がなされてきたが、Umezawa らにより提唱されたモデルが一般的なものとなっている（図 8）[50]。ABA が低濃度の時は、タンパク質脱リン酸化酵素である PP2C がリン酸化酵素である SnRK2 を脱リン酸化し、不活性化することで ABA シグナルをオフにしている。一方で、ABA の蓄積量が増加すると、ABA 受容体である RCAR/PYR/PYL が PP2C に結合し、PP2C の活性を抑制する。その結果、SnRK2 は PP2C による抑制から解放され、転写因子をリン酸化することでその機能を活性化させる。その結果として、ABA シグナルがオンとなり、さまざまな応答が引き起こされる。シロイヌナズナ（*A. thaliana*）では、14 種類からなる RCAR/PYR/PYL の遺伝子ファミリー（PYR1、PYL1～PYL13）が存在すると Park らにより明らかにされた[51]。PYL は機能重複しているため，その中で 1 つの PYL 遺伝子の機能が破壊されたとしても，ABA 非感受性にはならない。



(*S*)-(+)-2-*cis*-ABA　　(*R*)-(−)-2-*cis*-ABA　　アジドプローブ

図 7. ABA およびアジドプローブの構造.

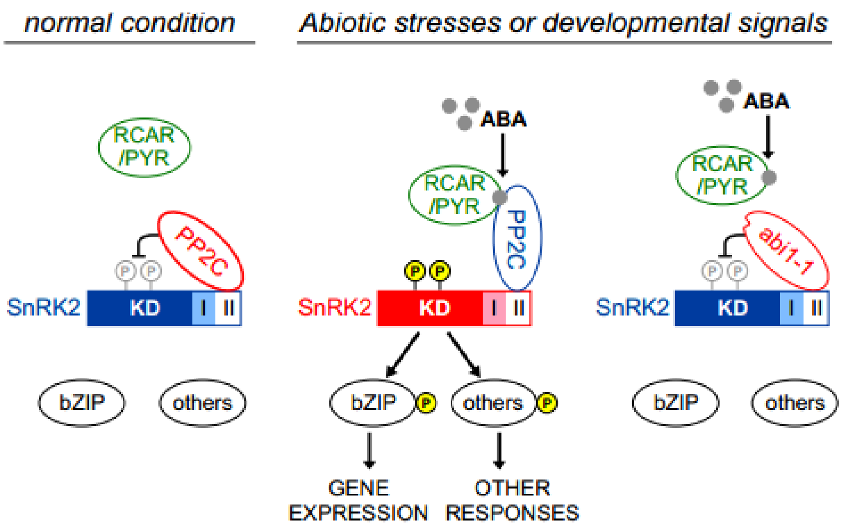


図 8. ABA のシグナル伝達機構 [50].

第 7 節　研究の目的

光アフィニティーラベル化法は、生理活性化合物の標的タンパク質を同定する手法として有用性が高い。その一方で、以下の二つの問題が指摘されている。

① 光反応基および検出用官能基の生理活性化合物への導入により、生理活性化合物が本来有していた標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合がある。
② 光反応基によるクロスリンク反応の収率は数%以下である。

そこで、本研究では、これらの問題点を克服する新規な標的タンパク質同定法の開発を目指す。①の問題点を克服する一つの方法として、光反応基を生理活性化合物に導入せず、生理活性化合物の修飾を最小にして標的タンパク質との相互作用を損なわせないことが考えられる。そこで、アジド基のみを導入した生理活性化合物（アジドプローブ）を標的タンパク質と相互作用させた後に、クリック反応により光反応基および検出用官能基を導入するという標的タンパク質検出法の開発を行った。開発した標的タンパク質検出法の有効性を確認するため、ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）の PpAOS1 とその阻害剤を対象としたモデル実験を行った。今回、リガンドとなる AOS 阻害剤の構造には、第 5 節に記載した AOS 阻害剤に対する構造活性相関の結果より、シロイヌナズナの AOS に対して最

も阻害活性の高い化合物 k（表 1）の構造を基本とした。アジドプローブには、検出用官能基と光反応基を導入するための足掛かりとして末端にアジド基を導入した化合物を合成することとした。アジド基は、コンパクトな官能基であり、かつ生体分子と水性環境に対してほぼ不活性であるため、アジド基を導入した阻害剤が本来有している生物活性を損なう可能性は低いと考えられる。

既存の光アフィニティーラベル化法が抱える②の問題を解決するため、光反応基の役割をアミノ基と特異的に反応するタンパク質架橋剤, bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt (BS3) に代替させた新たな標的タンパク質検出法を開発した。タンパク質架橋剤 BS3 は高い反応性でアミノ基に対して選択的に結合する。新規検出法では、アジドプローブを標的タンパク質と相互作用させた後、タンパク質架橋剤 BS3 により外側からタンパク質とアジドプローブをクロスリンクさせることで標的タンパク質の検出を試みる。植物ホルモンの一種であるアブシジン酸（ABA）とその受容体 PYL2 の相互作用に注目し、アジド基を導入した ABA を用いて PYL2 の検出を行った。また、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の検出感度について評価するため、アジドプローブと光反応基を用いる新規な標的タンパク質検出法との検出感度を比較した。

生理活性化合物の標的タンパク質同定のためには、標的タンパク質を精製する必要がある。精製された標的タンパク質を得ることで初めてアミノ酸配列の解析による同定が可能になる。検出用官能基（ビオチンなど）で修飾した生理活性化合物を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質の精製は多くの研究例がある。しかし、夾雑タンパク質の混入や回収率の低さという問題が生じ、標的タンパク質の同定が困難になる場合も少なくない。そこで、本研究ではより高収率な同定法の開発を目指した。新規標的タンパク質同定法では、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を基礎とし、ジスルフィド結合を有するタンパク質架橋剤, dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt（DTSSP）を BS3 の代わりに用いる。ジスルフィド結合は還元剤 dithiothreitol (DTT) により切断されるため、アフィニティークロマトグラフィーにおいて標的タンパク質の結合の後、還元剤を用いた溶出が可能となる。本同定法の有効性を確認するため、アブシジン酸（ABA）とその受容体 PYL2 の相互作用を対象としたモデル実験を

行った。また、本モデル実験において、未報告の ABA 結合タンパク質の存在が示唆されたため、本タンパク質の同定を行った。

第 2 章　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発

第 1 節　目的

生理活性化合物の標的タンパク質検出法である光アフィニティーラベル化法では、生理活性化合物と標的タンパク質のクロスリンクに光反応基が利用される。しかし、光反応基の生理活性化合物への導入により、生理活性化合物が本来有していた標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合があるという問題があった。そこで、本問題を解決する新規な標的タンパク質検出法の開発を目指した。

第 2 節　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の設計

既存の手法が抱える「標的タンパク質との相互作用の損失」という問題点を克服する一つの方法として、光反応基を生理活性化合物に導入せず、生理活性化合物の修飾を最小にして標的タンパク質との相互作用を損なわせないことが考えられる。そこで、新規検出法では、生理活性化合物にアジド基のみを導入することにより化学修飾を最小限にとどめたアジドプローブと標的タンパク質を相互作用させた後に、光反応基および検出用官能基をアジドプローブに導入することとした(図 9)。新規検出法の概要は以下の通りである。

① アジドプローブと標的タンパク質を混合し、それらの複合体を形成させる。
② アルキン、ベンゾフェノン（光反応基）およびビオチン（検出用官能基）を有するリンカーを添加し、アジド基とリンカーのアルキンをクリック反応により共有結合させる。
③ UV を照射し、標的タンパク質とアジドプローブ—リンカー複合体のクロスリンクを行う。
④ 検出用官能基を利用し、ウェスタンブロッティングなどにより標的タンパク質を検出する。

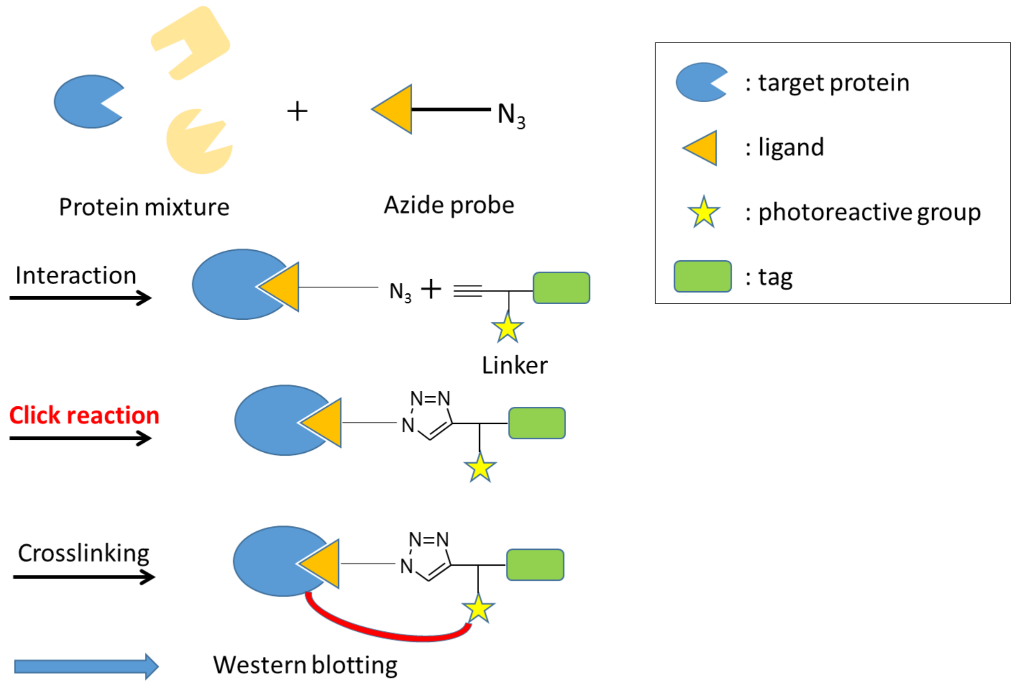


図 9. アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法.

本検出法で用いるリンカーの化学構造を図 10 に示す。本リンカーは、末端にビオチンおよびアルキン、中央部にベンゾフェノンを有する。アルキン部分は、タンパク質と相互作用したアジドプローブのアジド基とのクリック反応に用いる。この反応によって標的タンパク質検出のための官能基をアジドプローブに導入することができる。ベンゾフェノンは標的タンパク質とアジドプローブのクロスリンクのために導入することとした。検出用官能基として導入したビオチンは、ストレプトアビジンと特異的かつ強力に結合することが知られており、ウェスタンブロッティングによりアジドプローブ-標的タンパク質複合体の検出のために用いることとした。

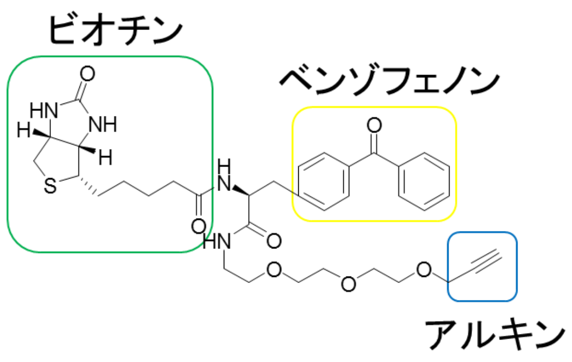
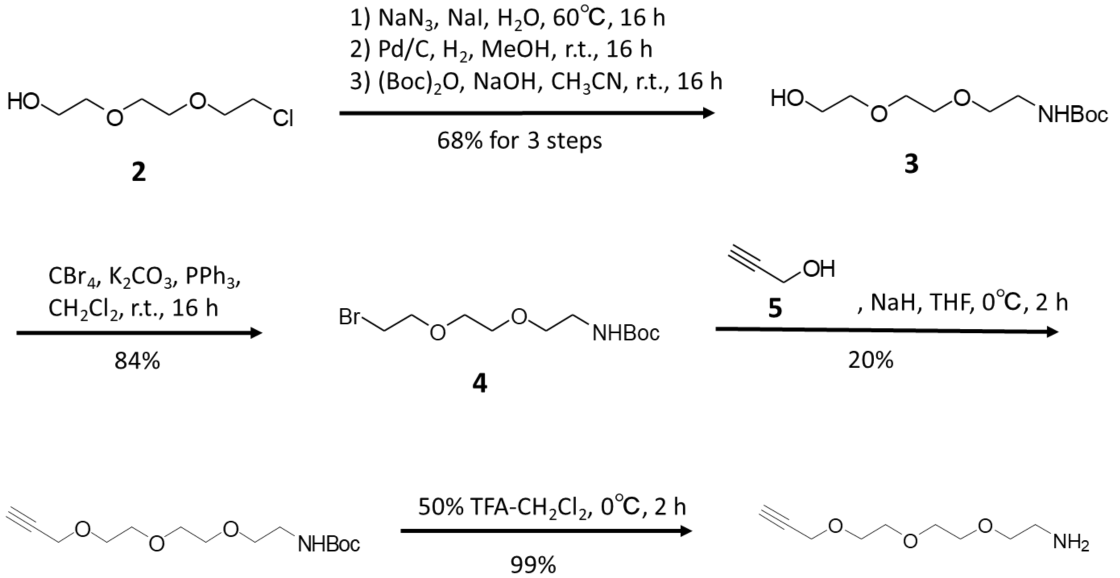


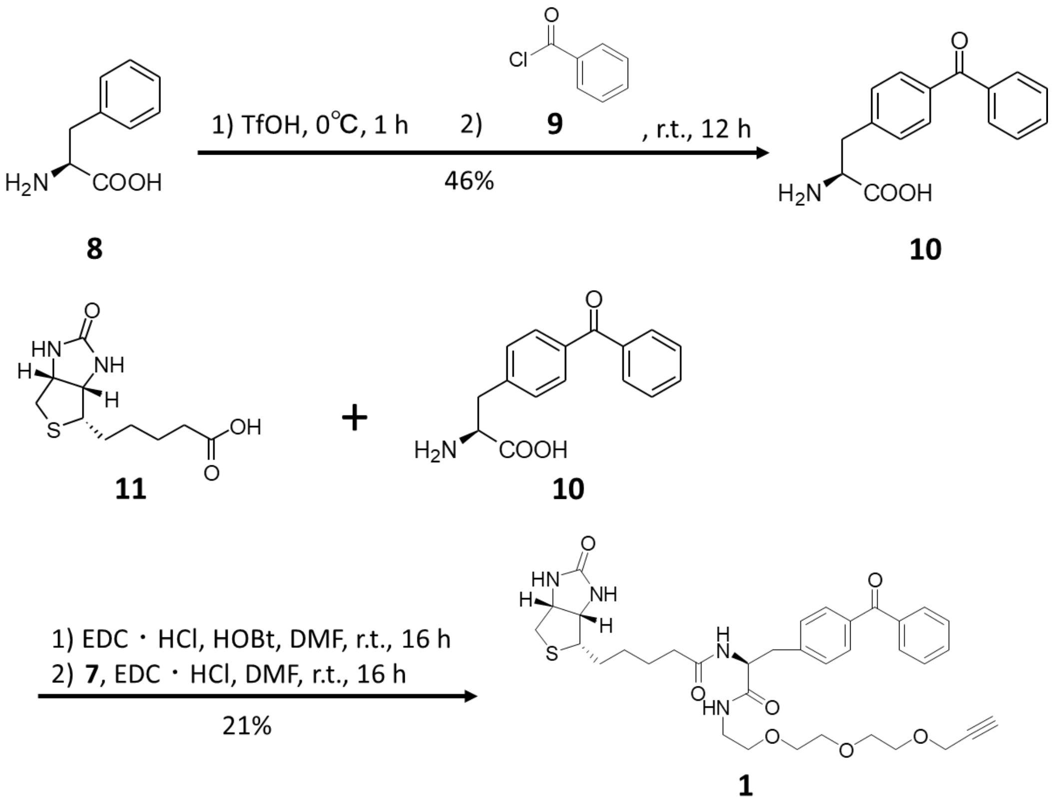
図 10. リンカー1 の構造.

第 3 節　光反応基を有するリンカーの合成

本研究で開発する新規な標的タンパク質検出法に必要な光反応基を有するリンカーを合成する。化合物 **2** を出発物質とし、塩素を求核置換反応によりアジド基に変換した後、接触還元によりアジド基をアミノ基に変換した。さらに、アミノ基を Boc 基で保護し、化合物 **3** を得た。化合物 **3** の水酸基を臭素に変換し、化合物 **4** を得た。2-Propyn-1-ol (**5**) の水酸基を NaH で脱プロトン化し、これを化合物 **4** の臭素が結合した炭素に求核置換反応させ、化合物 **6** を得た。TFA 処理により化合物 **6** の Boc 基を脱保護し、化合物 **7** を得た。

L-Phenylalanine (**8**)と benzoyl chloride (**9**) を TfOH 下で反応させ、化合物 **10** を得た。化合物 **10** と(+)-biotin (**11**) を縮合剤 EDC・HCl によりアミド化した。その後、化合物 **7** を加えてさらにアミド化し、リンカー**1** を得た。





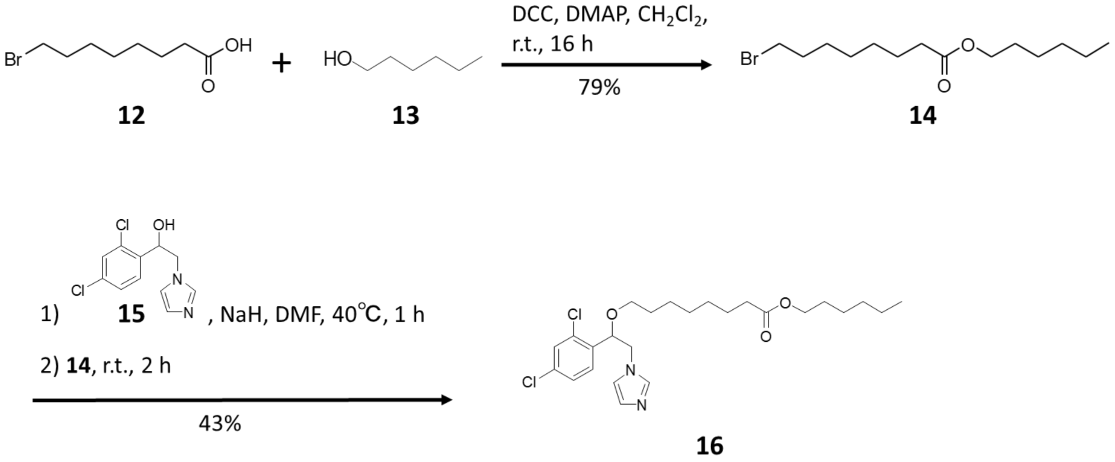
スキーム 1. リンカー**1** の合成.

第 4 節　PpAOS1 に対する阻害剤およびアジドプローブの合成

本研究においては、標的タンパク質として PpAOS1 をモデル実験に用いることとした。本来であれば、AOS 反応の基質である 13-HPOT にアジド基を誘導すべきであるが、その構造中のペルオキシ基の反応性の高さにより類縁体の合成は困難である。そこで、標的タンパク質である AOS に認識され化学修飾が可能な、AOS 阻害剤として報告のある 1-(1*H*-imidazol-1-yl)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethanol の誘導体をリガンドに選択した。この AOS 阻害剤とアジド基を導入した AOS 阻害剤（アジドプローブ）の合成を目的とし実験を行った。

第 1 項　PpAOS1 阻害剤の合成

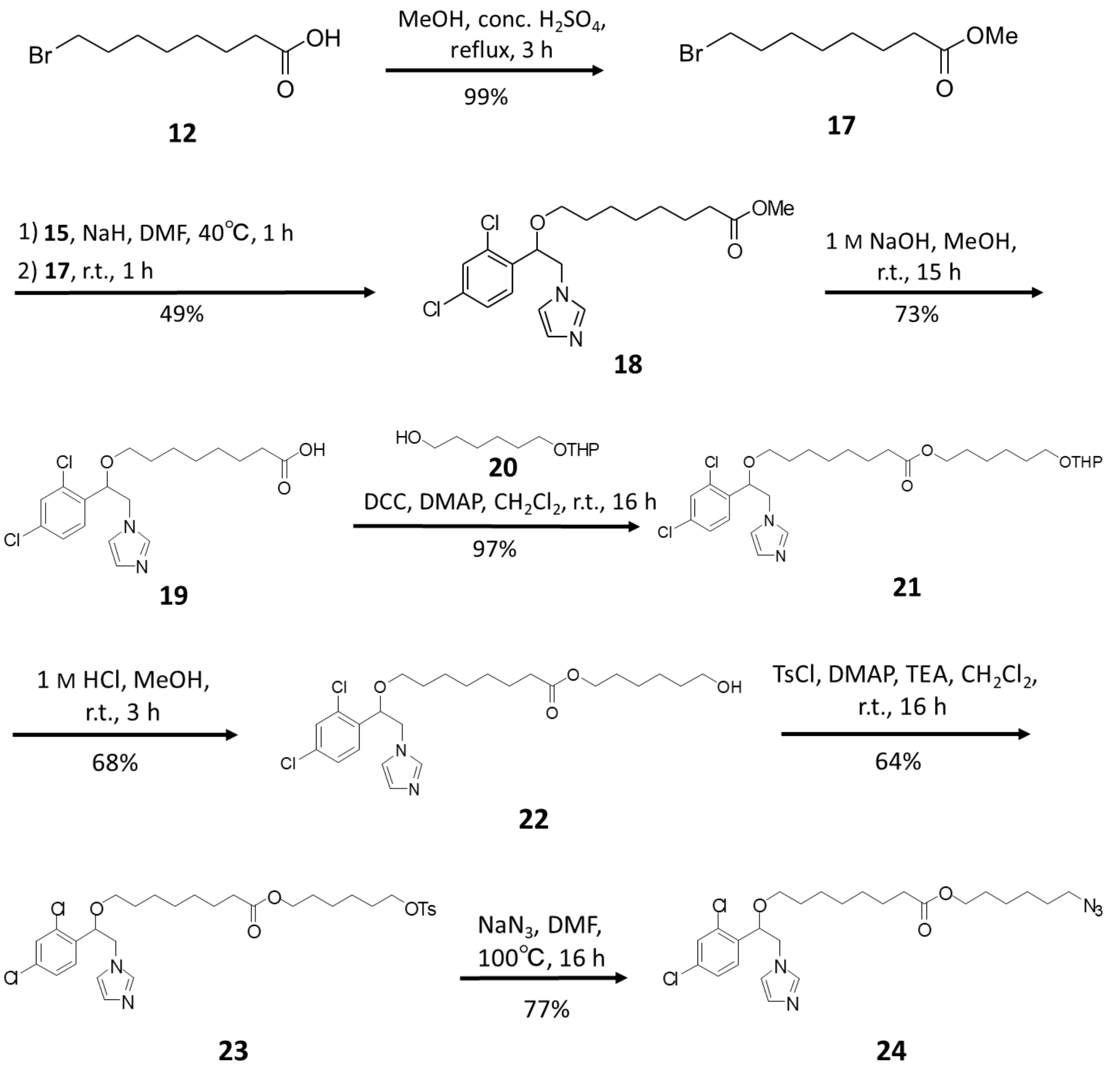
化合物 **12** と化合物 **13** を、縮合剤 DCC を用いて縮合し、化合物 **14** を得た。1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol (**15**) のヒドロキシ基水素を NaH で脱プロトン化し、化合物 **14** の臭素が結合した炭素へ求核置換反応させることで AOS 阻害剤 **16** を合成した。



スキーム 2.　AOS 阻害剤 **16** の合成 [40].

第 2 項　PpAOS1 に対するアジドプローブの合成

化合物 **12** を硫酸存在下、メタノール中で加熱し化合物 **17** を得た。1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol (**15**) のヒドロキシ基水素を NaH で脱プロトン化し、化合物 **17** の臭素が結合した炭素へ求核置換反応させることで化合物 **18** を得た。化合物 **18** を水酸化ナトリウムで加水分解して脱保護することにより化合物 **19** を得た。THP 基を一方に持つアルコール **20** と化合物 **19** を縮合剤 DCC で縮合反応することで化合物 **21** を得た。塩酸処理により化合物 **21** の THP 基を脱保護し化合物 **22** を得た。化合物 **22** の水酸基をトシル化し化合物 **23** とした後、トシル基をアジド基に変換し、アジドプローブ **24** を得た。



スキーム 3.　アジドプローブ **24** の合成.

第 5 節　アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性の検証

第 1 項　PpAOS1 の検出

アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性を確認するため、第 2 節で設計したモデルに従い PpAOS1 をアフィニティーラベル化できるかを検証した。アジドプローブ **24** と PpAOS1 をリン酸バッファー中（50 mM, pH 7.4）で 1 時間インキュベートした。その後、リンカー**1** を添加し、CuI 存在下でクリック反応を行った。

360 nm の UV を 1 時間照射し、PpAOS1 とアジドプローブ **24** のクロスリンクを行った。反応液を SDS-PAGE に供し、HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウェスタンブロッティングによりアフィニティーラベル化された PpAOS1 の検出を行った。その結果、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルが観察され、本プローブとリンカーを用いた標的タンパク質検出法が有効であると示された（図 11）。また、UV を照射しなかった場合は、ウェスタンブロッティングによる PpAOS1 のバンドは確認されなかった。さらに、アジドプローブ **24** が PpAOS1 に特異的に結合することを確認するため、対照タンパク質として PpAOC2 を用いて同様の実験を行ったところ、PpAOC2 に由来するバンドは確認されなかった（図 11）。これらの結果から、アジドプローブ **24** とリンカー**1** を用いて、標的タンパク質である PpAOS1 の特異的な検出が可能であることが示された。

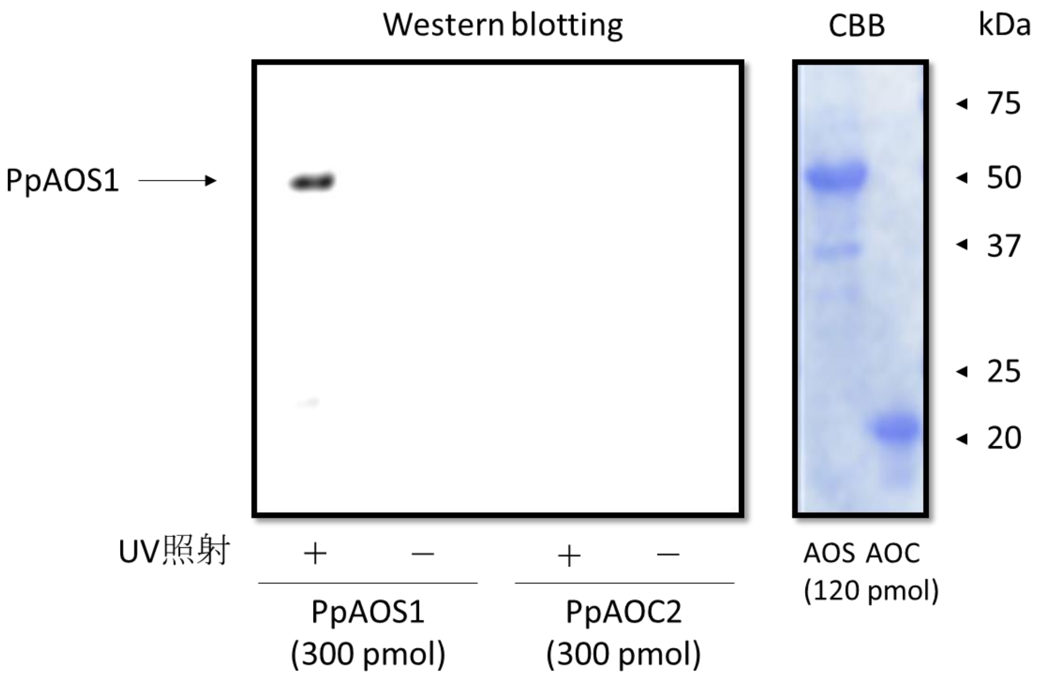


図 11. ウェスタンブロッティングによる PpAOS1 の検出.

第 2 項　化学発光シグナルに対する PpAOS1 の濃度依存性

PpAOS1 の最終濃度を 1.25 µM から 10.0 µM まで変化させた時の、PpAOS1 に由来するバンドの化学発光シグナル強度の変化を調べた。アジドプローブ **24** およびリンカー**1** の最終濃度は 30 µM とした。その結果、PpAOS1 の濃度が 1.25 µM から 10.0 µM の範囲では、

濃度依存的にシグナル強度が高くなることが確認された（図 12)。

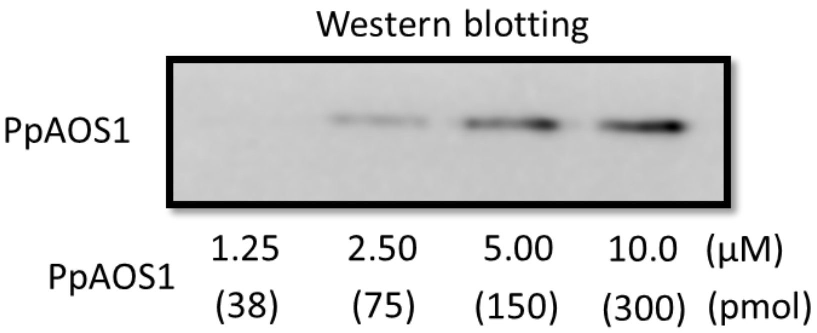


図 12. 化学発光シグナルに対する PpAOS1 の濃度依存性.

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **24** の濃度依存性

アジドプローブ **24** の最終濃度を 3 nM から 3000 nM と変化させた時の、PpAOS1 に由来するバンドのシグナル強度の変化を調べた。PpAOS1 およびリンカー**1** の最終濃度は、それぞれ 10 μM および 30 μM とした。その結果、アジドプローブ **24** の濃度が 3 nM から 3000 nM の範囲では濃度依存的にシグナル強度の増加が観察された（図 13)。従って、第 2 節で設計したモデル通り、PpAOS1 とアジドプローブ **24** の結合を介して PpAOS1 のアフィニティーラベル化が行われていることが示された。

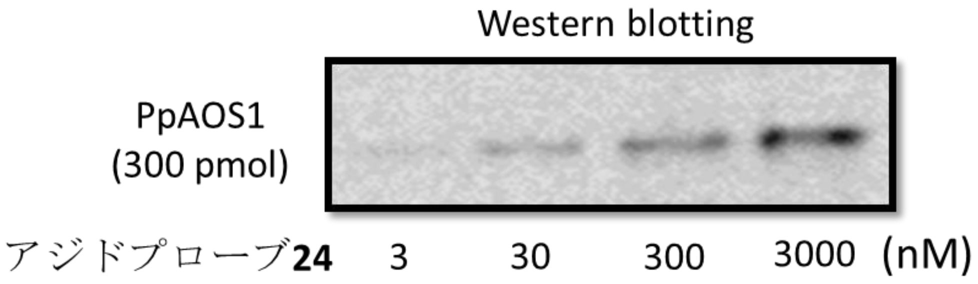


図 13. 化学発光シグナルに対するアジドプローブ **24** の濃度依存性.

第 4 項　アジドプローブ **24** の有効性の確認

第 1 項から第 3 項における実験ではアジドプローブ **24** と PpAOS1 を相互作用させた後に、リンカー**1** をクリック反応により導入していた。そこで、はじめにアジドプローブ **24**

とリンカー**1** をクリック反応で結合させた後に、生成物を PpAOS1（最終濃度 10 μM）とインキュベートし、ウェスタンブロッティングに供した。その結果、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルはほとんど確認されなかった (図 14)。これは、あらかじめクリック反応によりリンカー**1** をアジドプローブ **24** に導入することで、プローブ分子が嵩高くなり PpAOS1 との相互作用が損なわれたためであると考えられた。

また、本手法の有用性を確認するにあたり、PpAOS1 に対するアジドプローブ **24** の結合部位が AOS 阻害剤 **16** の結合部位と同一であることを示す必要がある。そこで、PpAOS1（最終濃度 10 μM）とアジドプローブ **24**（最終濃度 30 μM）をインキュベートする際に 10 倍量の AOS 阻害剤 **16**（最終濃度 300 μM）を同時に添加し、反応を行った。その結果、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルはほとんど確認されなかった (図 14)。アジドプローブ **24** と AOS 阻害剤 **16** の化学構造が著しく類似していることを合わせて考えると、PpAOS1 に対するアジドプローブ **24** と AOS 阻害剤 **16** の結合部位は同一であることが示された。

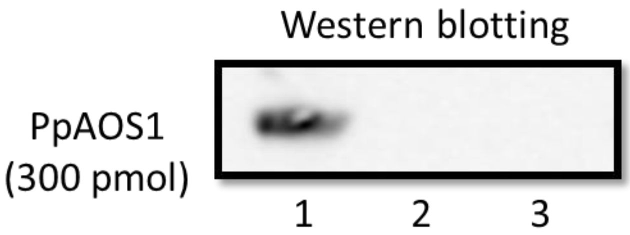


図 14. アジドプローブ **24** の有効性の確認.

レーン 1 : コントロール、レーン 2 : あらかじめアジドプローブ **24** とリンカー**1** を結合させた場合、レーン 3 : 過剰量の AOS 阻害剤 **16** を添加した場合

第 5 項　大腸菌粗酵素液中の PpAOS1 の検出

未知の標的タンパク質を同定する際には他の多くの夾雑タンパク質が存在する中で標的タンパク質を検出する必要がある。そこで組換え PpAOS1 を生産する大腸菌から抽出したタンパク質粗抽出液（0.50 mg/ml）を用いて検出を行った。その結果、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルが検出された (図 15)。このことから本手法を用いて、多くの夾雑タンパク質が存在する中で標的タンパク質を特異的に検出できることが確認された。

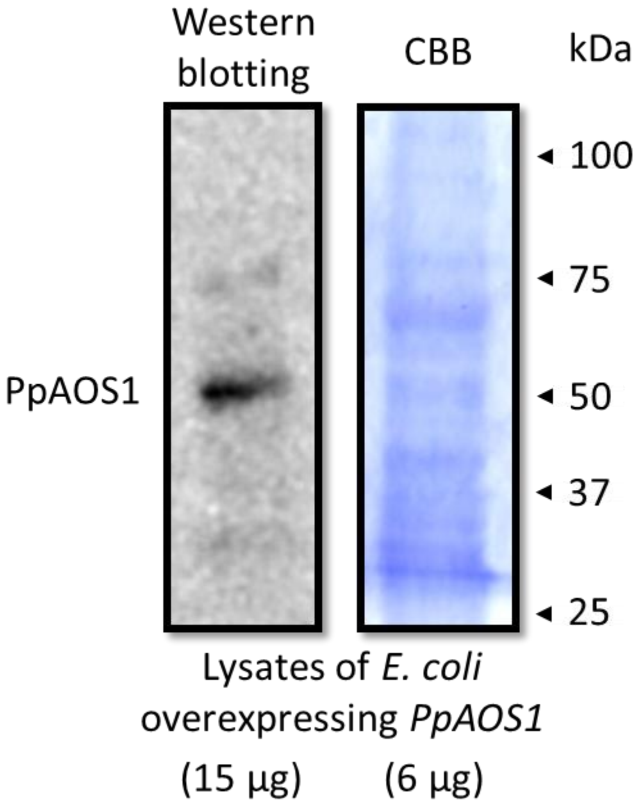


図 15. 大腸菌粗酵素液中の PpAOS1 の検出.

第 3 章　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発

第 1 節　目的

既存の光アフィニティーラベル化法では、生理活性化合物と標的タンパク質のクロスリンクに光反応基が利用される。しかし、光反応基によるクロスリンク反応の収率は数%以下であり、検出感度の低さが指摘されてきた。そこで、より検出感度の高い標的タンパク質検出法の開発を目指した。

第 2 節　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の設計

既存の手法が抱える「検出感度の低さ」という問題点を克服する一つの方法として、光反応基のクロスリンクの役割を別の化合物に代替させることが考えられる。そこで、この役割を、タンパク質架橋剤に代替させた新たな標的タンパク質検出法の設計を行った。タンパク質架橋剤は、分子の両端に 2 つの官能基を有する化合物であり、1 級アミノ基やチオール基を有する化合物同士を結合させることが可能である。この性質から、タンパク質架橋剤は、酵素と抗体の結合体の作成や近接した 2 つのタンパク質の結合等に広く使用されている。タンパク質架橋剤の一つである bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt (BS3) (**25**) は、*N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端に有しており、アミノ基同士を特異的に架橋できる（図 16)。また、BS3 は分子の末端にスルホン酸基が導入されており、水に容易に溶解するため、有機溶媒を用いることなくタンパク質の標識反応を行うことが可能である。そこで、新規検出法では、標的タンパク質が元来有している 1 級アミノ基を利用し、タンパク質架橋剤 BS3 により標的タンパク質とアジドプローブをクロスリンクさせることで標的タンパク質の検出を行う。BS3 は高い反応性を有しているため、新規検出法の検出感度の高さを期待した。新規検出法の概要は以下の通りである（図 17)。

① アジドプローブとタンパク質粗抽出液をインキュベートし、相互作用させる。
② アルキン、アミノ基およびビオチン（検出用官能基）を有するリンカーを添加し、クリック反応であるヒュスゲン環化付加反応によりアジドプローブに結合させる。
③ BS3 によりアミノ基を介して標的タンパク質とリンカーを結合させる。

④ 検出用官能基を利用し、ウェスタンブロッティングなどにより標的タンパク質を検出する。

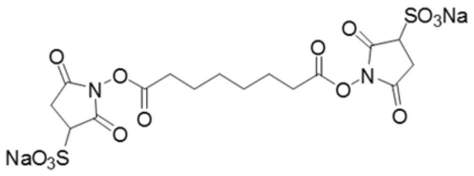


図 16. タンパク質架橋剤 BS3 (**25**)の化学構造.

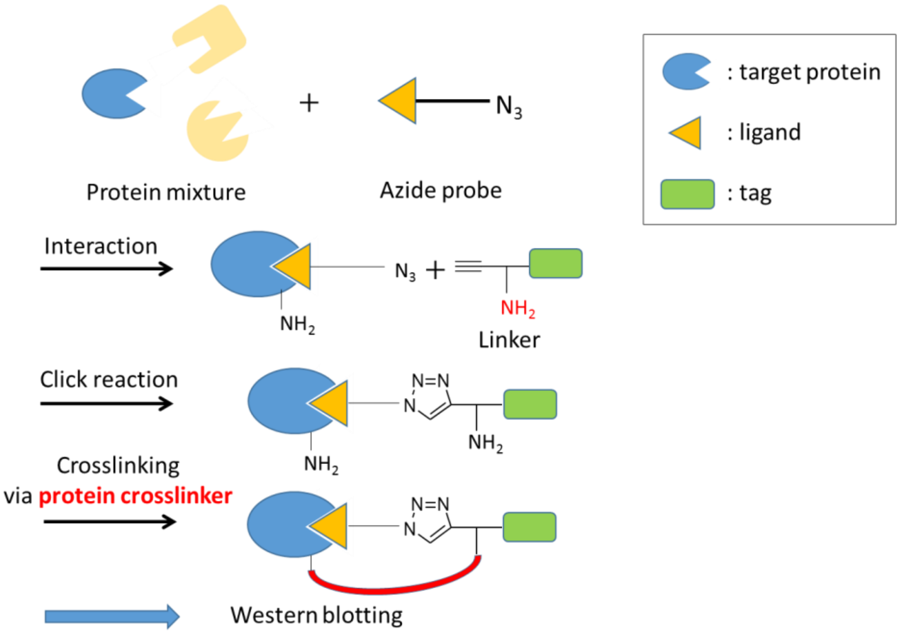


図 17. クリック反応とタンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法.

本検出法で用いるリンカーの化学構造を図 18 に示す。本リンカーは、末端にビオチンおよびアルキン、中央部にアミノ基を有する。リンカーのアルキン部分は、タンパク質と相互作用したアジドプローブのアジド基とのクリック反応に用いる。この反応によって検出用フラグメントをアジドプローブに導入することができる。アミノ基は、タンパク質架橋剤 BS3 を用いた標的タンパク質とアジドプローブのクロスリンクのために導入した。検出用官能基として導入したビオチンは、ストレプトアビジンと特異的かつ強力に結合することが知られており、ウェスタンブロッティングによりアジドプローブ-標的タンパク質複合体の検出のために用いることとした。

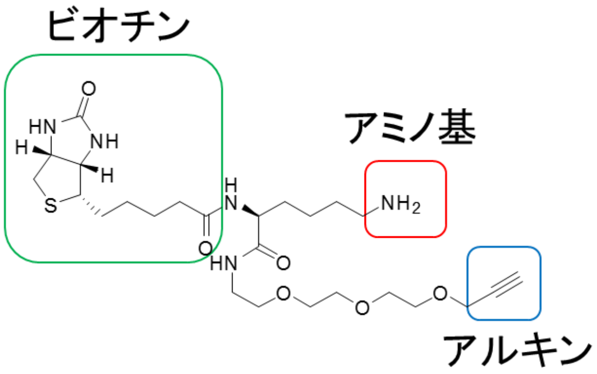
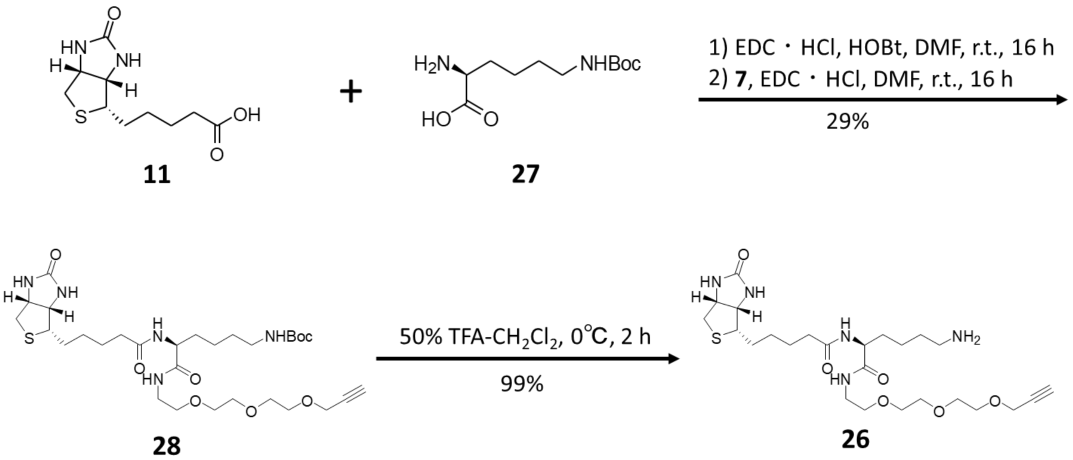


図 18. リンカー**26** の構造.

第 3 節　アミノ基を有するリンカーの合成

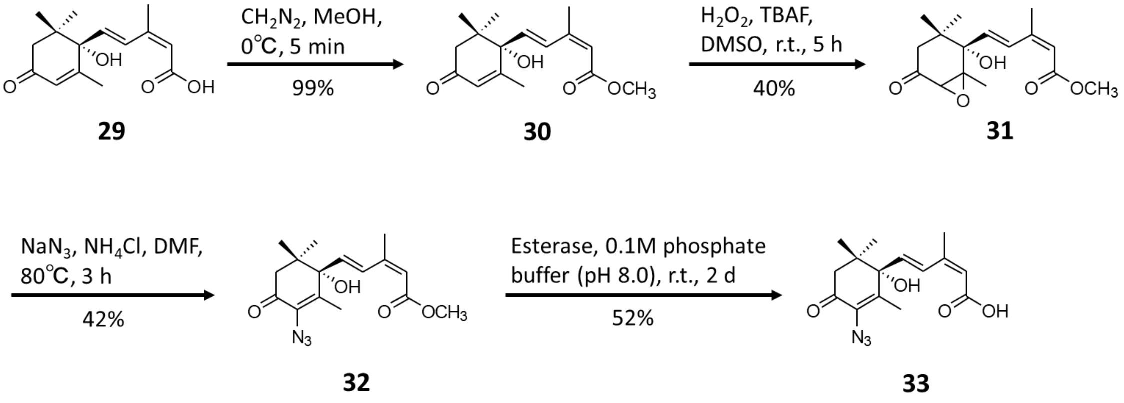
本研究で開発する新規な標的タンパク質検出法に必要なアミノ基を有するリンカーを合成する。第 2 章第 3 節と同様に、化合物 **2** を出発原料とし、化合物 **7** を得た。 (+)-Biotin (**11**)と N^{α}-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysine (**27**) を縮合剤 EDC・HCl によりアミド化した。その後、化合物 **17** を加えてさらにアミド化し、化合物 **28** を得た。化合物 28 の Boc 基を脱保護することによりリンカー**26** を得た。



スキーム 4.　リンカー**26** の合成.

第 4 節　AtPYL2 に対するアジドプローブの合成

タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性の高さを確認するため、アブシジン酸（ABA）とその受容体 AtPYL2 の相互作用を対象としたモデル実験を行うこととした。そこで、既に報告されているアジド基を導入した ABA（アジドプローブ **33**）の合成を目的とし実験を行った [49)]。ABA (**29**) を出発物質とし、メチルエステル化により化合物 **30** を得た。過酸化水素による求核的エポキシ化反応により化合物 **31** を得た後、アジ化ナトリウムで処理することで化合物 **32** を得た。最後に、エステラーゼによるメチルエステルの加水分解によりアジドプローブ **33** を得た。



スキーム 5. アジドプローブ **33** の合成 [49)].

第 5 節　タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性の検証

第 1 項　AtPYL2 の検出

合成したアジドプローブ **33**、リンカー**26** およびタンパク質架橋剤 BS3 を用いて AtPYL2 の検出を行った。まず、アジドプローブ **33** と AtPYL2 をリン酸バッファー（50 mM, pH 7.4）中で 1 時間インキュベートした。その後、リンカー**26** および CuI を添加し、クリック反応によるカップリングを行った。さらに、タンパク質架橋剤 BS3 を添加し、AtPYL2 とアジドプローブ **33** のクロスリンクを行った。反応液を SDS-PAGE に供し、HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウェスタンブロッティングにより AtPYL2 の検出を行った。その結果、AtPYL2 に由来する化学発光シグナルが観察された（図 19）。また、BS3 を添加しな

かった場合、ウェスタンブロッティングによる AtPYL2 のシグナルは確認されなかった。さらに、アジドプローブ **33** が AtPYL2 に特異的に結合することを確認するため、対照タンパク質として PpAOC2 を用いて同様の実験を行ったところ、PpAOC2 に由来するバンドは確認されなかった（図 19)。これらの結果から、アジドプローブ **33** とリンカー**26** を用いて、標的タンパク質である AtPYL2 の検出が可能であることが確認された。従って、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる標的タンパク質検出法が有効であると示された。

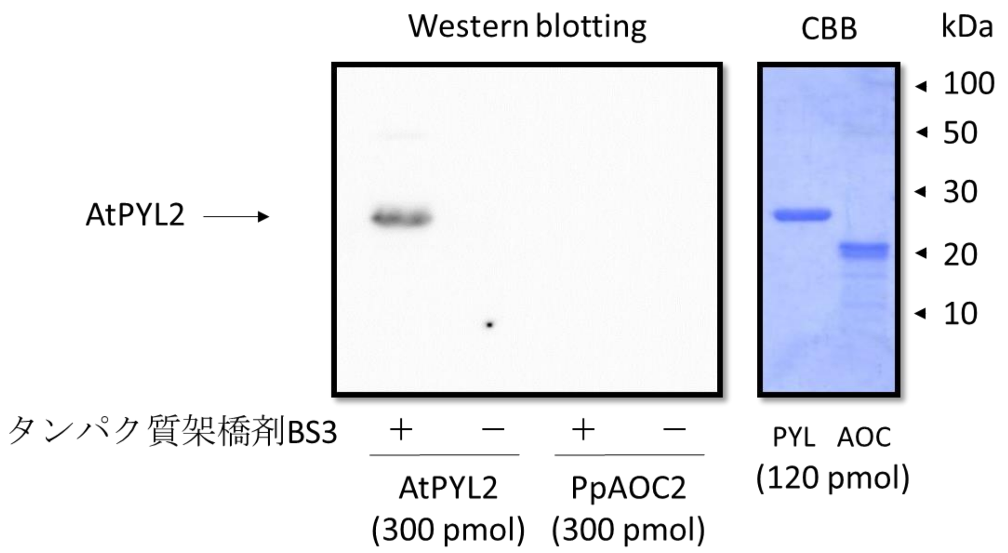


図 19. ウェスタンブロッティングによる AtPYL2 の検出.

第 2 項　化学発光シグナルに対する AtPYL2 の濃度依存性

AtPYL2 の最終濃度を 1.3 μM から 10 μM まで変化させた時の、AtPYL2 に由来するバンドの化学発光シグナル強度の変化を調べた。ここでは、アジドプローブ **33** およびリンカー**26** の最終濃度を 40 μM とし、第 2 項と同様の方法でタンパク質の検出を行った。その結果、AtPYL2 の最終濃度が 1.3 μM から 10 μM の範囲では、濃度依存的にシグナル強度が高くなることが確認された（図 20)。

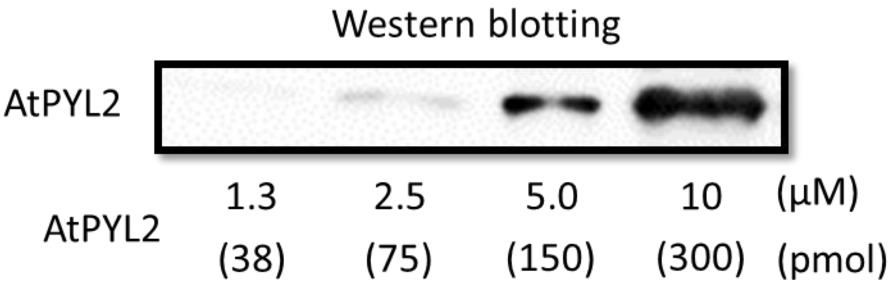


図 20. 化学発光シグナルに対する AtPYL2 の濃度依存性.

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性

アジドプローブ **33** の最終濃度を 0.4 nM から 400 nM と変化させた時の、AtPYL2 に由来するバンドのシグナル強度の変化を調べた。AtPYL2 およびリンカー**26** の最終濃度は、それぞれ 2.5 µM および 40 µM とした。その結果、アジドプローブ **33** の濃度が 0.4 nM から 400 nM の範囲では濃度依存的にシグナル強度の増加が観察された（図 21）。従って、第 2 節で設計したモデル通り、AtPYL2 とアジドプローブ **33** の結合を介して、AtPYL2 がアフィニティーラベル化されていることが示された。

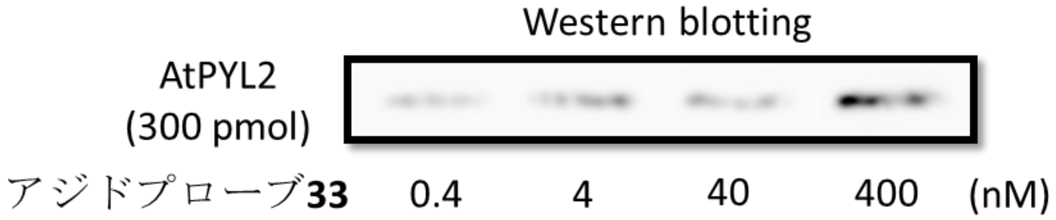


図 21. 化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性.

第 4 項　アジドプローブ **33** の有効性の確認

はじめにアジドプローブ **33** とリンカー**26** をクリック反応で結合させた後に、生成物を AtPYL2（最終濃度 10 µM）とインキュベートし、ウェスタンブロッティングに供した。その結果、AtPYL2 に由来する化学発光シグナルはほとんど確認されなかった（図 22）。これは、あらかじめクリック反応によりリンカー**26** をアジドプローブ **33** に導入することで、プローブ分子が嵩高くなり AtPYL2 との物理化学的相互作用が損なわれたためであると考え

られる。従って、既存の光アフィニティーラベル化法が抱える「標的タンパク質と生理活性化合物の親和性の損失」という問題を本手法が克服したことが示された。

また、AtPYL2 に対するアジドプローブ **33** の結合部位と ABA の結合部位が同一であることを示すため、AtPYL2（最終濃度 10 μM）とアジドプローブ **33**（最終濃度 40 μM）をインキュベートする際に 10 倍量の ABA (**29**) (最終濃度 400 μM) を同時に添加し、反応を行った。その結果、AtPYL2 に由来する化学発光シグナルはほとんど確認されなかった（図 22)。アジドプローブ **33** と ABA の化学構造が著しく類似していることを合わせて考えると、AtPYL2 に対するアジドプローブ **33** と ABA の結合部位は同一であることが示された。

図 22. アジドプローブ **33** の有効性の確認.
レーン 1：コントロール、レーン 2：あらかじめアジドプローブ **33** とリンカー**26** を結合させた場合、レーン 3：過剰量の ABA を添加した場合

第 5 項　大腸菌粗酵素液中の AtPYL2 の検出

多くの夾雑タンパク質が存在する中でも AtPYL2 を特異的に検出できるか調べるため、組換え AtPYL2 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液（2.0 mg/ml）を用いて検出を行った。その結果、AtPYL2 に由来する化学発光シグナルが特異的に検出された。この結果から、本手法を用いて多くの夾雑タンパク質が存在する中で標的タンパク質を特異的に検出できることが確認された（図 23)。

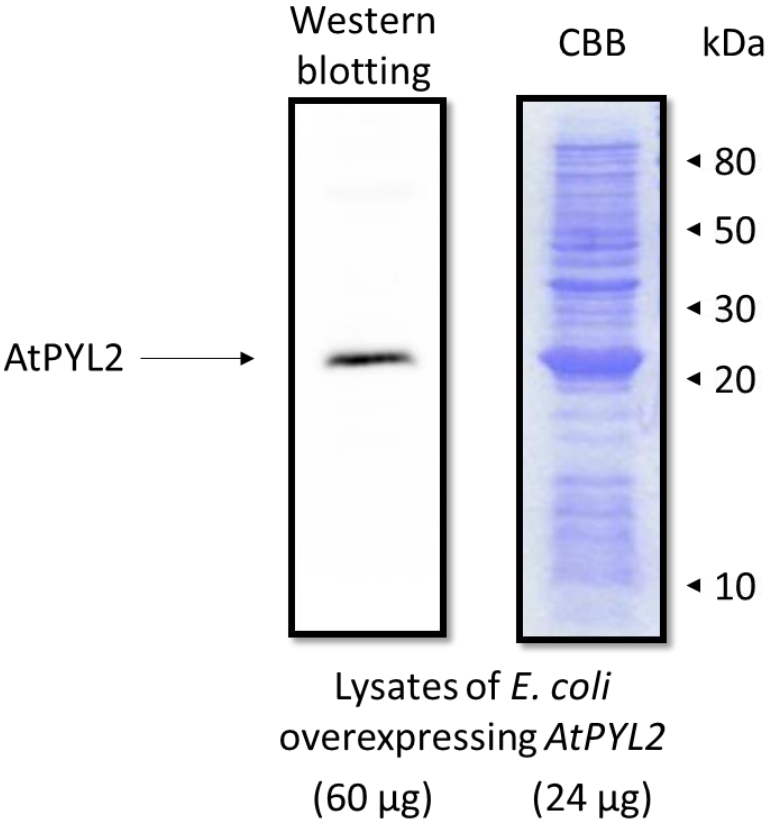


図 23. 大腸菌粗酵素液中の AtPYL2 の検出.

第 6 節　クロスリンクの方法が異なる 2 つの標的タンパク質同定法の比較

標的タンパク質同定法を評価する上で、検出感度は重要な指標の一つである。そこで、タンパク質架橋剤 BS3 およびアミノ基を有するリンカー**26** を用いる手法と、光反応基を有するリンカー**1** を用いる手法の検出感度を比較した。

第 1 項　AtPYL2 検出における検出感度の比較

タンパク質架橋剤 BS3 およびアミノ基を有するリンカーを用いる標的タンパク質検出法と、光反応基を有するリンカーを用いる標的タンパク質検出法の検出感度を比較するため、標的タンパク質検出における各種条件を同一にし、シグナル強度を比較した。本実験では、標的タンパク質として AtPYL2 を用いた。リンカー**1** あるいはリンカー**26** を用いた反応液をウェスタンブロッティングに供し、タンパク質の検出を行った。AtPYL2、アジドプロー

ブ **33** およびリンカーの最終濃度は、それぞれ 10 μM、40 μM および 40 μM に統一した。その結果、タンパク質架橋剤 BS3 およびアミノ基を有するリンカー**26** を用いて標的タンパク質の検出を行った方が、光反応基を有するリンカー**1** を用いた場合よりも AtPYL2 に由来する化学発光シグナル強度は高かった（図 24）。この結果から、光反応基を有するリンカー**1** を用いる標的タンパク質検出法の検出感度よりも、タンパク質架橋剤 BS3 およびアミノ基を有するリンカー**26** を用いる標的タンパク質検出法の方が高感度であることが示された。

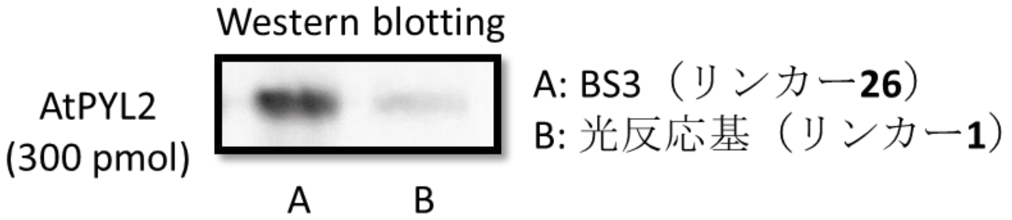


図 24. AtPYL2 検出における 2 つの標的タンパク質同定法の比較.

第 2 項　PpAOS1 検出における検出感度の比較

標的タンパク質を PpAOS1 とし、第 1 項と同様の実験を行った。PpAOS1、アジドプローブ **24** およびリンカーの最終濃度は、それぞれ 10 μM、30 μM および 300 nM に統一した。その結果、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法の方が PpAOS1 に由来する化学発光シグナル強度は高かった（図 25）。この結果は、AtPYL2 を対象とした実験の結果（図 24）と一致していた。すなわち、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる標的タンパク質検出法が光反応基を有するリンカーを用いる手法より高感度であることが再確認された。

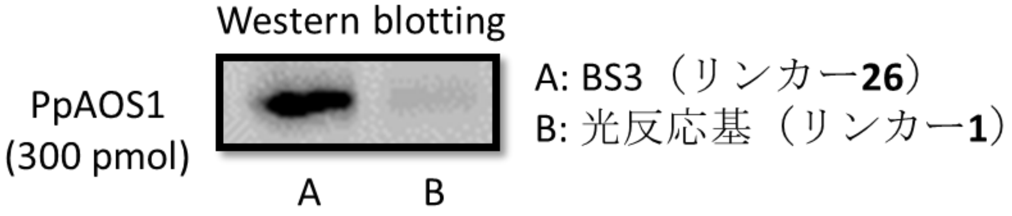


図 25. PpAOS1 検出における 2 つの標的タンパク質同定法の比較.

第 4 章　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の開発

第 1 節　目的

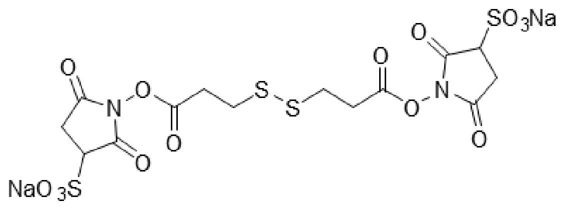
　生理活性化合物の標的タンパク質を同定するためには、その分子量を明らかにするだけでなく、標的タンパク質を精製し、アミノ酸配列の解析を行う必要がある。そこで、第 3 章で開発したタンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を基礎とした新規な標的タンパク質同定法の開発を目指した。

第 2 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の設計

　新規同定法では、前述のタンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を基礎とし、アジドプローブおよびリンカー**26** を用いてビオチン（検出用官能基）を標的タンパク質に導入する。生成した複合体は、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用を利用することで、ストレプトアビジン結合セファロース担体に結合させることが可能である。一方で、アビジン-ビオチン複合体の解離には過酷な条件が求められるため、ストレプトアビジン結合セファロース担体から標的タンパク質を溶出し、同定のための分析を行うことは困難である。そこで、本章で開発する新規な標的タンパク質同定法では、第 3 章で開発した新規な標的タンパク質検出法とは異なり、タンパク質架橋剤として BS3 の代わりに分子内ジスルフィド結合を有する dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt (DTSSP) (**34**) を用いることとした（図 26）。DTSSP は、BS3 と同様に *N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端に有しており、アミノ基同士を特異的に架橋できる。一方で、ジスルフィド結合は DTT などの還元剤により切断可能であるため、アフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質の精製において還元剤を用いた特異的な溶出が可能となる。DTSSP を用いた新規な標的タンパク質同定法の概要は以下の通りである（図 27）。

① タンパク質粗抽出液とアジドプローブ、リンカー**26** およびタンパク質架橋剤 DTSSP を反応させ、標的タンパク質にビオチン（検出用官能基）を導入する。
② ストレプトアビジン結合セファロースを担体としたカラムに本サンプルを供する。
③ 尿素を含むバッファーを用いて非特異的に担体に結合したタンパク質を洗浄する。

④ 還元剤 DTT を含むバッファーにより DTSSP の分子内ジスルフィド結合を切断し、標的タンパク質の溶出を行う。



DTSSP

図 26. タンパク質架橋剤 DTSSP (34) の化学構造.

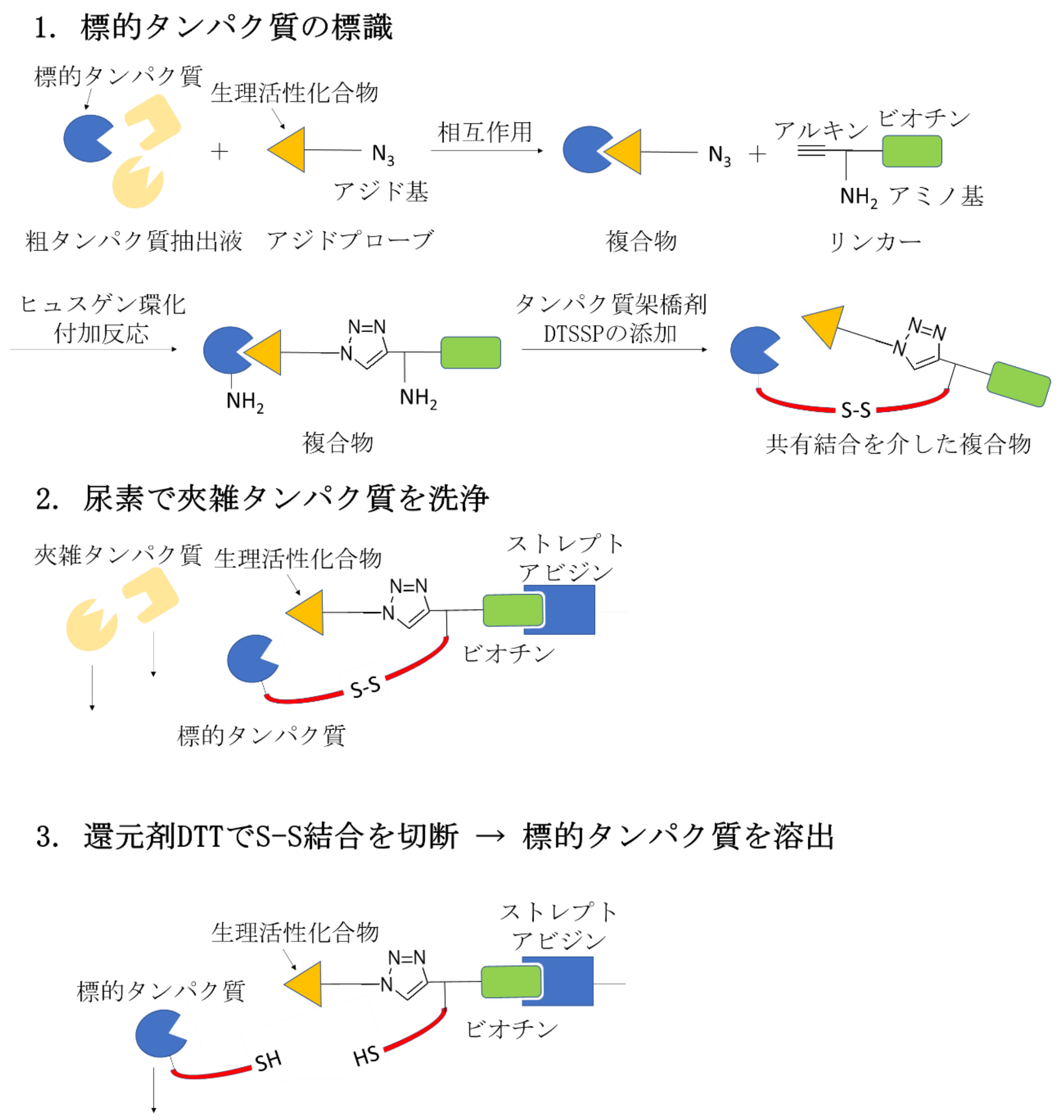


図 27. タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる標的タンパク質の新規な同定法.

第 3 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の有効性の検証

第 1 項　タンパク質粗抽出液からの AtPYL2 の精製

新規同定法の有効性を確認するため、ABA と AtPYL2 の相互作用を対象としたモデル実験を行った。第 2 節に示した手順に従い、組換えタンパク質 AtPYL2 を過剰発現させた大腸菌由来のタンパク質粗抽出液（100 µg/ml）とアジドプローブ **33**、リンカー**26** およびタ

ンパク質架橋剤 DTSSP (34) を反応させた。反応後のタンパク質粗抽出液をストレプトアビジン担体に供したあと、2 M 尿素溶液により夾雑タンパク質の洗浄を行った。その後、100 mM DTT 溶液によりタンパク質の溶出を試みた。溶出画分を SDS-PAGE 解析に供した結果、AtPYL2 の分子量と一致するバンドが確認された (図 28)。本タンパク質が AtPYL2 であるか調べるため、溶出画分をトリプシン消化後、nano LC-MS/MS によるアミノ酸配列解析に供した。その結果、AtPYL2 由来の 3 種類のペプチドが検出された (図 29)。従って、溶出画分に含まれるタンパク質は AtPYL2 由来であると確認されたため、新規同定法が有効であると示された。

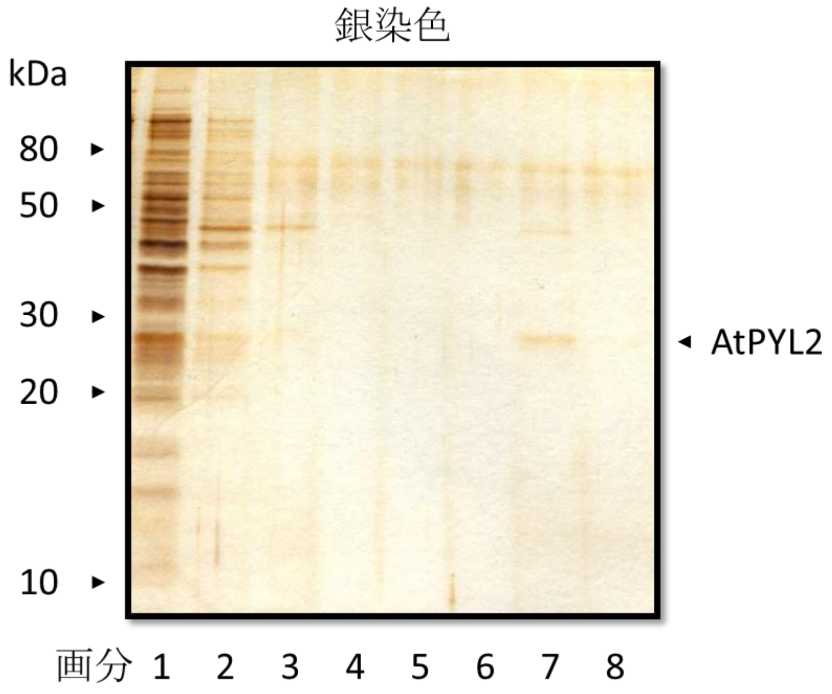


図 28. 大腸菌タンパク質粗抽出液からの AtPYL2 の精製.

画分 1：非吸着、画分 2-6：尿素による洗浄、画分 7-8：DTT による溶出.

1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFMSSS
41 PAVKGLTDEE QKTLEPVIKT YHQFEPDPTT CTSLITQRIH
81 APASVVWPLI RRFDNPERYK HFVKRCRLIS GDGDVGSVRE
121 VTVISGLPAS TSTERLEFVD DDHRVLSFRV VGGEHRLKNY
161 KSVTSVNEFL NQDSGKVYTV VLESYTVDIP EGNTEEDTKM
201 FVDTVVKLNL QKLGVAATSA PMHDDE

図 29. 溶出画分 7 から検出されたペプチド断片.

赤字で示したアルファベットは nano LC-MS/MS で検出されたペプチド配列.

第 2 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ 33 の濃度依存性

反応液にアジドプローブ **33** を添加しなかった場合は、SDS-PAGE 解析において溶出画分の AtPYL2 に由来するバンドはほぼ消滅した（図 30）。また、反応液に添加するアジドプローブ **33** の最終濃度を 0.04 nM から 400 nM まで変化させたときの AtPYL2 の溶出量を調べた。なお、溶出画分に含まれる AtPYL2 は anti-His tag 抗体を用いて検出した。その結果、添加したアジドプローブ **33** の濃度依存的に溶出される AtPYL2 量が増加していることが確認された（図 31）。これらの結果から、第 2 節で設計したモデル通り、AtPYL2 とアジドプローブ **33** の結合を介して、AtPYL2 のアフィニティーラベル化が進んだことが示された。

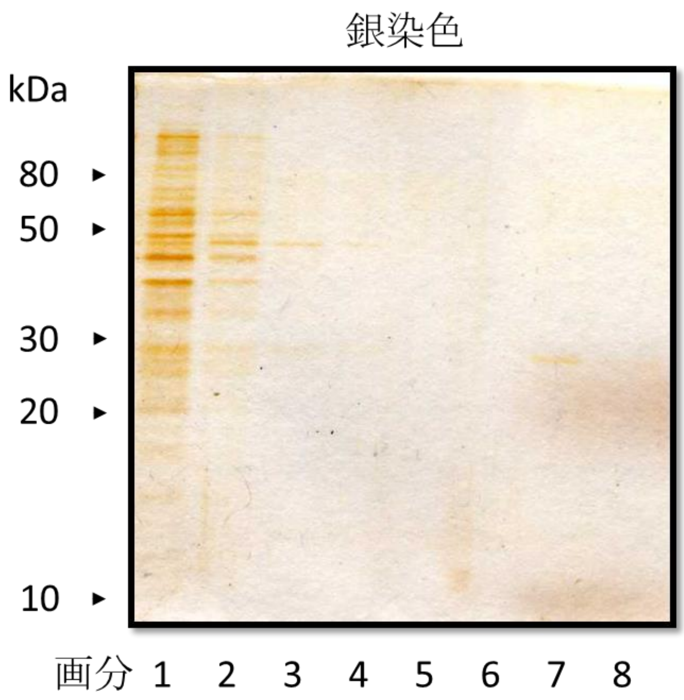


図 30. アジドプローブ **33** を添加しなかった場合の各画分の SDS-PAGE.

画分 1：非吸着、画分 2-6：尿素による洗浄、画分 7-8：DTT による溶出.

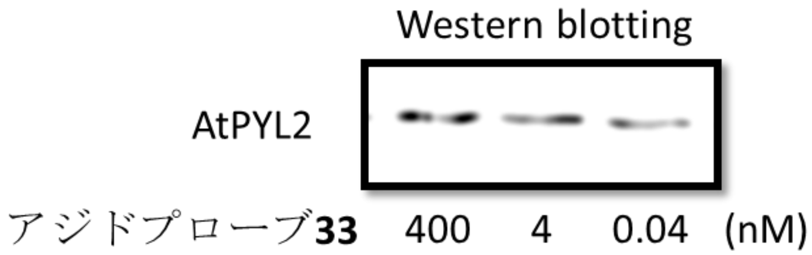


図 31. AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の濃度依存性.

第 3 項　AtPYL2 精製における DTSSP の濃度依存性

反応液に DTSSP を添加しなかった場合は、SDS-PAGE 解析において溶出画分の AtPYL2 に由来するバンドはほぼ消滅した（図 32）。また、反応液に添加する DTSSP の最終濃度を 0.04 nM から 400 nM まで変化させたときの AtPYL2 の溶出量を調べた。なお、溶出画分に含まれる AtPYL2 は anti-His tag 抗体を用いて検出した。その結果、添加した DTSSP

の濃度依存的に溶出される AtPYL2 量が増加していることが確認された（図 33)。これらの結果から、第 2 節で設計したモデル通り、DTSSP により AtPYL2 とアジドプローブ **33** のクロスリンクが行われたことが確認された。

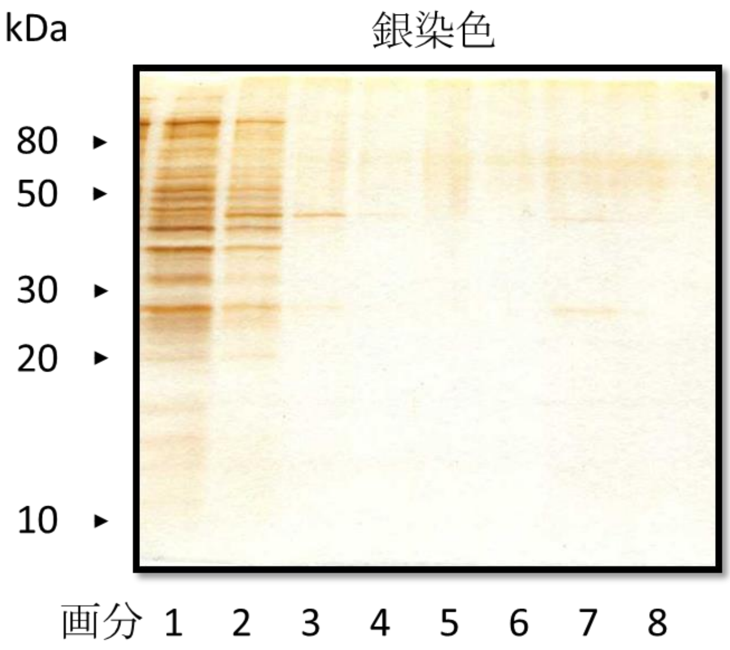


図 32. タンパク質架橋剤 DTSSP を添加しなかった場合の各画分の SDS-PAGE.
画分 1：非吸着、画分 2-6：尿素による洗浄、画分 7-8：DTT による溶出.

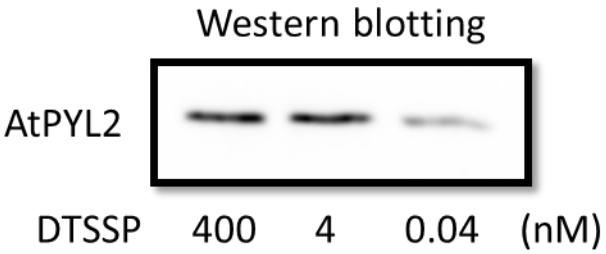


図 33. AtPYL2 精製における DTSSP の濃度依存性.

第 4 項　AtPYL2 精製におけるタンパク質粗抽出液の濃度依存性

反応液に添加するタンパク質粗抽出液の最終濃度を 10 μg/ml から 100 μg/ml まで変化さ

せたときの AtPYL2 の溶出量を調べた。なお、溶出画分に含まれる AtPYL2 は anti-His tag 抗体を用いて検出した。その結果、タンパク質粗抽出液の濃度依存的に溶出される AtPYL2 量が増加していることが確認された（図 34）。

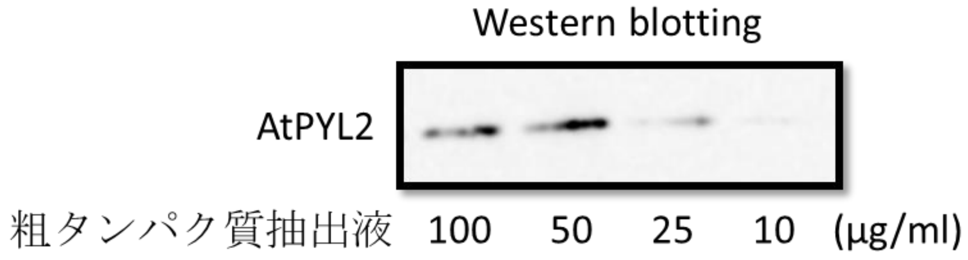


図 34. AtPYL2 精製におけるタンパク質粗抽出液の濃度依存性.

第 5 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の有効性の検証

あらかじめアジドプローブ **33** とリンカー**26** をクリック反応で結合させた後に、生成物をタンパク質粗抽出液（100 μg/ml）とインキュベートし、AtPYL2 の精製を行った。その結果、溶出画分に AtPYL2 に由来するバンドはほとんど確認されなかった（図 35）。これは、あらかじめクリック反応によりリンカー**26** をアジドプローブ **33** に導入することで、プローブ分子が嵩高くなり AtPYL2 との相互作用が損なわれたためであると考えられる。

タンパク質粗抽出液（100 μg/ml）とアジドプローブ **33** をインキュベートする際に 100 倍量の ABA（**29**）を同時に添加し、反応を行った。その結果、AtPYL2 はほとんど溶出されなかった（図 36）。この結果から、設計したモデルの通り、AtPYL2 とアジドプローブ **33** の結合を介して AtPYL2 がアフィニティーラベル化され、ストレプトアビジン担体に結合していることが確認された。

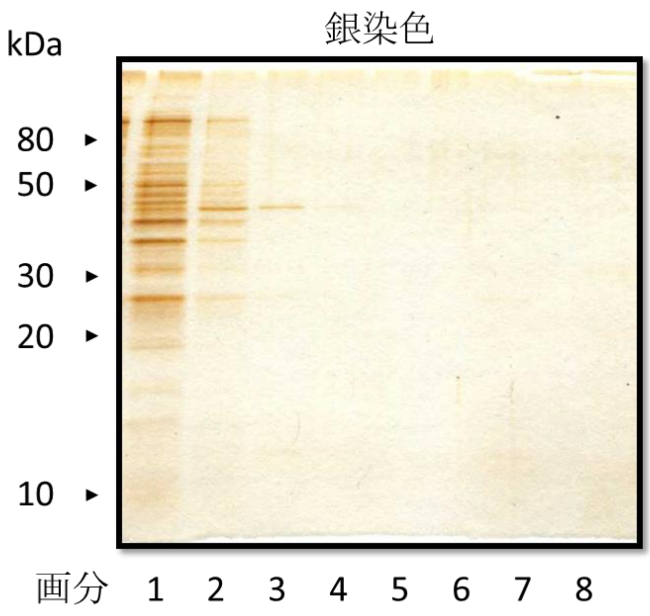


図 35. あらかじめアジドプローブ **33** とリンカー**26** を結合させた場合の各画分の SDS-PAGE.

画分 1：非吸着、画分 2-6：尿素による洗浄、画分 7-8：DTT による溶出

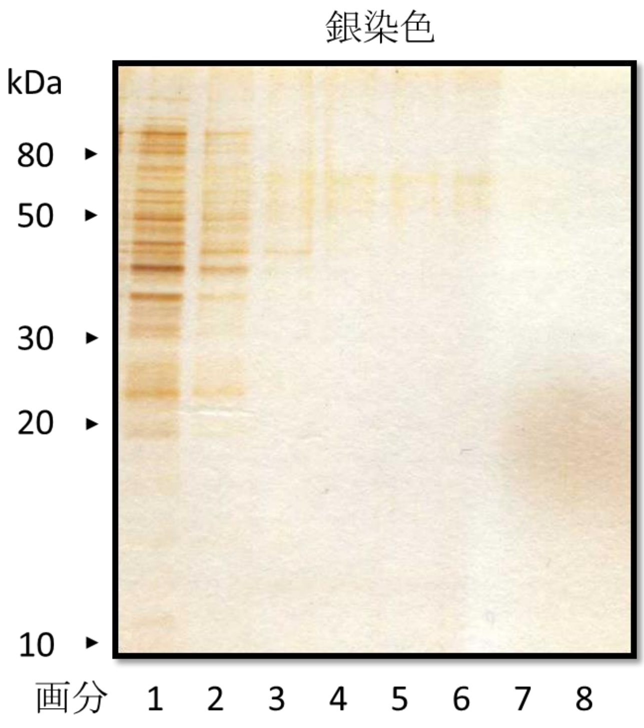


図 36. 過剰量の ABA (**29**) を添加した場合の各画分の SDS-PAGE.

画分 1：非吸着、画分 2-6：尿素による洗浄、画分 7-8：DTT による溶出.

第 5 章　シロイヌナズナの未報告のアブシジン酸結合タンパク質の同定

第 1 節　目的

第 4 章において、新規に開発された生理活性化合物の標的タンパク質同定法を用いて大腸菌タンパク質抽出液中の組換え AtPYL2 の同定に成功した。本手法のさらなる有用性の証明を目的とし、シロイヌナズナのタンパク質粗抽出液より ABA 結合タンパク質の同定を試みた。

第 2 節　シロイヌナズナ由来のタンパク質粗抽出液からのアブシジン酸結合タンパク質の精製

シロイヌナズナ（*A. thaliana*）由来のタンパク質粗抽出液を用いて ABA 結合タンパク質の精製を行うにあたり、植物体として PP2C 遺伝子（AT4G26080）の欠損株を用いることとした。第 1 章、第 6 節に示した通り、ABA と RCAR/PYR/PYL は結合した際に PP2C と複合体を形成する。従って、RCAR/PYR/PYL とアジドプローブ **33** が結合しても、アジド基が PP2C に覆い隠されリンカーが導入できないことを懸念したためである。シロイヌナズナの PP2C (AT4G26080) 欠損株由来のタンパク質粗抽出液（1.0 mg/ml）とアジドプローブ **33**、リンカー**26** およびタンパク質架橋剤 DTSSP (**34**)を反応させ、ストレプトアビジン担体に供し、RCAR/PYR/PYL の精製を試みた。しかし、溶出画分に RCAR/PYR/PYL に由来するバンドは確認されなかった（図 37)。これは、RCAR/PYR/PYL がシロイヌナズナ内に微量しか存在しないことも一要因であると考えられる。こうした生体内に微量に存在する標的タンパク質をより効率的に精製するように手法を改良していく必要があると考えられる。一方で、SDSPAGE 解析において溶出画分にはいくつかのタンパク質のバンドが確認された（図 37)。その中でも、分子質量が約 11～12 kDa に濃いタンパク質のバンドが見られた。この結果から、シロイヌナズナには、RCAR/PYR/PYL 以外の ABA 結合タンパク質が存在することが示された。

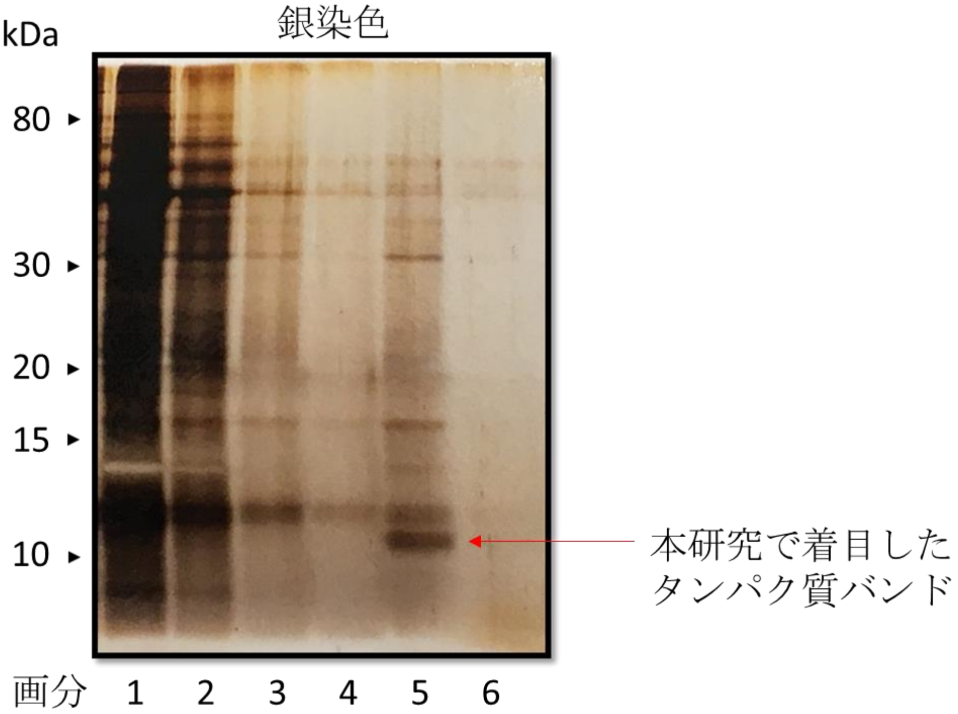


図 37. シロイヌナズナ由来のタンパク質粗抽出液からの ABA 結合タンパク質の精製.

画分 1：非吸着、画分 2-4：尿素を含むバッファーによる洗浄、画分 5-6：DTT を含むバッファーによる溶出.

第 3 節　アブシジン酸結合タンパク質のアミノ酸配列解析

図 38 の溶出画分 5 の電気泳動ゲルを銀染色により染色した。ABA 結合タンパク質と予想される分子質量 11～12 kDa のタンパク質バンドを切り出し、脱銀処理、脱塩処理、還元アルキル化処理およびトリプシン消化を行った。トリプシン消化後の反応液を nano LC-MS/MS に供し、生成したペプチド断片の解析を行った。その結果、Thioredoxin h3 (AtTRXh3) (AT5G42980, 13.1 kDa)由来の 2 種類のペプチドが検出された（図 38）。

1 MAAEGEVIACHTVEDWTEKLKAANESKKLIVIDFTATWCP
41 PCRFIAPVFADLAKKHLDVVFFKVDVDELNTVAEEFKVQA
81 MPTFIFMKEGEIKETVVGAAKEEIIANLEKHKTVVAAA

図 38. AtTRXh3 のアミノ酸配列.

赤字で示したアルファベットは nano LC-MS/MS で検出されたペプチド配列.

第 4 節　大腸菌を用いた組換え AtTRXh3 の作製

ABA と AtTRXh3 の相互作用について詳細に調べるため、大腸菌を用いて組換え AtTRXh3 の作製を行った。シロイヌナズナから作製された cDNA を用いて、プラスミド pET23a-AtTRXh3 を得た。得られたプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、本株の培養液に IPTG を添加することで、AtTRXh3 を C 末端 His-tag 融合タンパク質として過剰発現させた。細胞破砕液可溶性画分を Ni-NTA クロマトグラフィーを用いて精製した。本操作により、1 L の培養液より 0.5 mg の組換え AtTRXh3 を得た（図 39)。

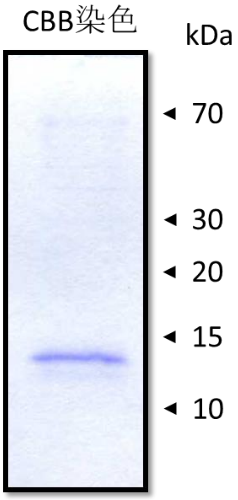


図 39. 組換え AtTRXh3 の SDS-PAGE.

第 5 節　ABA と組換え AtTRXh3 の結合解析

タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を用いて、組換え AtTRXh3 の検出を試みた。第 3 章の記載に従い、組換え AtTRXh3 とアジドプローブ **33**、リンカー **26** およびタンパク質架橋剤 BS3 (**25**) を反応させ複合体を形成させた。反応液を SDS-PAGE に供し、HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウェスタンブロッティングにより AtTRXh3 の検出を行った。その結果、AtTRXh3 に由来する化学発光シグナルが観察された（図 40)。また、AtTRXh3 とアジドプローブ **33** を反応させる際に、100 倍量の ABA (**29**) を同時に添加した場合、AtTRXh3 に由来する化学発光シグナルは著しく消失した (図 40)。これは、AtTRXh3 への結合に対し、アジドプローブ **33** と ABA で競合が起こったためであ

ると考えられる。さらに、添加するアジドプローブ **33** の濃度依存的に AtTRXh3 の化学発光シグナルが増加した（図 41）。これらの結果から、ABA と組換え AtTRXh3 が結合することが示され、AtTRXh3 が ABA 結合タンパク質であることが証明された。

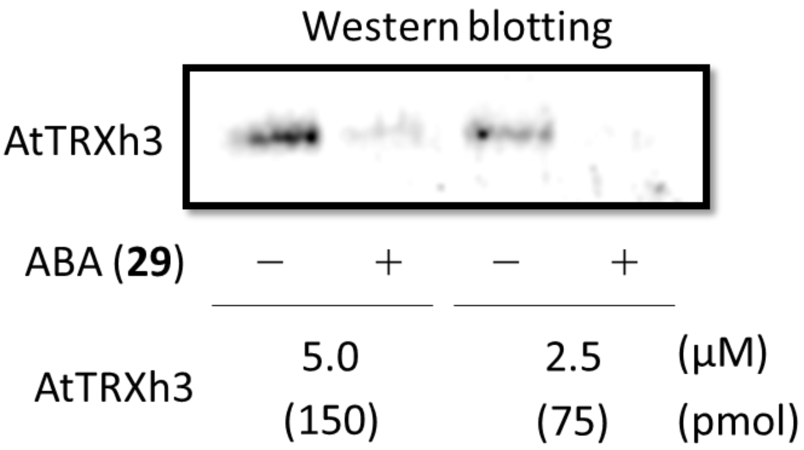


図 40. 過剰量の ABA 添加による結合競合試験.

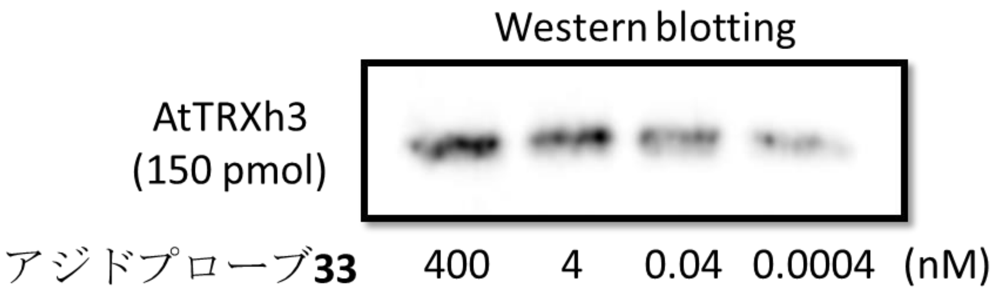


図 41. AtTRXh3 検出に対するアジドプローブ **33** の濃度依存的.

第 6 章　総論

１）アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法

光アフィニティーラベル化法は、低分子生理活性化合物の標的タンパク質を同定する手法として有用性が高い。しかし、この手法では低分子生理活性化合物に嵩高い化合物である光反応基を導入する必要があり、これにより標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合があるという問題点があった。この問題点を克服するため、本研究では、アジド基を導入した低分子生理活性化合物（アジドプローブ）と、ベンゾフェノン、アルキンおよびビオチンを有するリンカーを用いた新たな標的タンパク質検出法を開発した（図 9)。設計した新規検出法の有効性を確認するため、植物ホルモンのジャスモン酸生合成経路中の酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ（PpAOS1）と既知の AOS 阻害剤の相互作用の検出を行った。まず、末端にビオチンおよびアルキン、中央部にベンゾフェノンを有するリンカー **1** を合成した（スキーム 1)。シロイヌナズナアレンオキシドシンターゼ（AtAOS2）に対して阻害活性を持つ化合物を参考に、AOS 阻害剤 **16** および末端にアジド基を導入したアジドプローブ **24** を合成した（スキーム 2, 3)。

組換え PpAOS1 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液を用い、本手法により PpAOS1 の検出を行った。その結果、ウェスタンブロッティング解析において PpAOS1 に由来する化学発光シグナルが特異的に検出された（図 15)。従って、本手法は多くの夾雑タンパク質存在下でも標的タンパク質の検出が可能であることが示され、未知の標的タンパク質同定に有用であることが示唆された。さらにアジドプローブ **24** と PpAOS1 をインキュベートする際に同時に過剰量の AOS 阻害剤 **16** を添加したところ、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルは検出されなかった（図 14)。この結果は、アジドプローブ **24** が AOS 阻害剤 **16** と同様の酵素部位に結合していることを示唆している。また、アジドプローブ **24** とリンカー**1** をあらかじめクリック反応により結合させた化合物をプローブとして用いた場合、PpAOS1 に由来する化学発光シグナルは検出されなかった（図 14)。これは、プローブとなる化合物に大きな修飾基を導入することにより標的タンパク質との相互作用が失われるためであると考えられ、本手法において標的タンパク質とアジドプローブを相互作用させた後にクリック反応により光反応基を有するリンカーを導入することの有用性が示された。

２）タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法

光反応基によるクロスリンク反応の収率は数%以下であるため、光アフィニティーラベル化法の検出感度の低さが指摘されてきた。そこで、より検出感度の高い標的タンパク質検出法の開発を目指した。これまでの光アフィニティープローブにおける光反応基の役割をアミノ基と特異的に反応するタンパク質架橋剤 BS3 (**25**) に代替させた新たな標的タンパク質検出法を開発した（図 17)。タンパク質架橋剤 BS3 は、*N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端に有しており、アミノ基に対して選択的に結合する。BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の有効性を確認するため、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸（ABA）とその受容体である AtPYL2 の相互作用を対象とした種々の実験を行った。末端にビオチンおよびアルキン、中央部にアミノ基を有するリンカーを合成した（スキーム 4)。また、既知の方法に従い、アジドプローブ **33** を合成した（スキーム 5)。

組換え AtPYL2 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液を用い、本手法により AtPYL2 の検出を行った。その結果、ウェスタンブロッティング解析において AtPYL2 に由来する化学発光シグナルが観察された（図 23)。この結果から、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法により、特異的に標的タンパク質を検出できることが示された。

また、本手法の検出感度を評価するため、クロスリンクの方法が異なる 2 つの手法について検出感度の比較を行った。光反応基を有するリンカー**1** を用いる標的タンパク質検出法と、タンパク質架橋剤 BS3 とリンカー**26** を用いる標的タンパク質検出法を用いて AtPYL2 の検出を行い、その化学発光シグナルを比較した。その結果、光反応基を有するリンカー**1** を用いる手法よりタンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法の方がより高感度に AtPYL2 を検出できた（図 24)。この結果は、タンパク質架橋剤 BS3 とリンカー**26** を用いる手法の検出感度の高さを示している。高い検出感度を持つ標的タンパク質検出法は、これまで知られていない標的タンパク質をより効率良く検出できる可能性を持ち、本手法が多くの標的タンパク質の検出に応用されることが期待される。

３）タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法

生理活性化合物の標的タンパク質同定のためには、その分子量を明らかにするだけでなく、標的タンパク質を精製し、質量分析によりアミノ酸配列を解析する必要がある。しかし、これまでに報告されている標的タンパク質同定法では、夾雑タンパク質の混入や回収率の

低さという問題が生じ、標的タンパク質の同定が困難になる場合も少なくない。そこで、本研究ではより効率の良い標的タンパク質同定法の開発を行った。新規な標的タンパク質同定法では、アミノ基を有するリンカー**26** と、分子内にジスルフィド結合を持つタンパク質架橋剤 DTSSP (**34**) を用いて標的タンパク質のアフィニティーラベル化を行った (図 27)。DTSSP は分子内にジスルフィド結合を有するため、アフィニティーカラムの際に DTT による特異的な標的タンパク質の溶出が期待された。

前述の新規な標的タンパク質同定法の有効性を確認するため、ABA 由来のアジドプローブ **33** を用いて、組換え AtPYL2 を発現した大腸菌のタンパク質粗抽出液から AtPYL2 の精製を行った。尿素溶液による溶出画分を SDS-PAGE 解析に供した結果、AtPYL2 の分子量付近にバンドが確認された（図 28)。本画分をトリプシン消化後、nano LC-MS/MS によりペプチド断片のアミノ酸配列を解析したところ、AtPYL2 由来のペプチドが検出された（図 29)。従って、本標的タンパク質同定法を用いてタンパク質粗抽出液から標的タンパク質を同定できることが示された。

また、AtPYL2 は、アジドプローブ **33** および DTSSP (**34**) の濃度依存的に溶出されていることが確認された（図 31, 33)。さらに、アジドプローブ **33** とリンカー**26** をあらかじめ結合させた場合や、過剰量の ABA (**29**) を添加した場合、溶出される AtPYL2 量は著しく減少した（図 35, 36)。これらの結果から、図 27 の概略に示した通りに標的タンパク質のアフィニティーラベル化が進んでいると推定された。

４）シロイヌナズナの未報告の ABA 結合タンパク質の同定

大腸菌を用いたモデル実験で標的タンパク質の同定に成功した。次に、シロイヌナズナ（*A. thaliana*）由来のタンパク質粗抽出液を用いて RCAR/PYR/PYL の精製を試みた。その結果、DTT による溶出画分に RCAR/PYR/PYL に由来するバンドは確認されなかった (図 37)。これは、RCAR/PYR/PYL がシロイヌナズナ内に微量しか存在しないことが一つの要因であると考えられ、こうした生体内に微量に存在する標的タンパク質をより効率的に精製するように手法を改良していく必要があると考えられる。DTSSP を用いる標的タンパク質同定法の改良の一つの手立ては、標的タンパク質のアフィニティーラベル化の収率を向上させることである。本研究では、粗タンパク質抽出液に添加するアジドプローブおよび DTSSP の濃度条件については検討を行ったが、各化合物との反応時間や反応温度については検討できなかった。本研究では、粗タンパク質抽出液と各化合物のすべての反応を氷上で

行ったが、室温などより温度が高い条件で反応を進めることで標的タンパク質のアフィニティーラベル化がより進む可能性がある。また、粗タンパク質抽出液と各化合物の反応時間を変えることで、標的タンパク質のアフィニティーラベル化の収率が向上するかもしれない。

シロイヌナズナ（*A. thaliana*）由来のタンパク質粗抽出液を用いた実験において、未報告の ABA 結合タンパク質の存在が示唆された（図 37）。そこで、溶出画分の電気泳動後のゲルから本タンパク質のバンドを切り出し、トリプシン消化を行った後、ペプチド断片の解析を行った。その結果、 Thioredoxin h3 (AtTRXh3) (AT5G42980, 13.1 kDa) 由来の 2 種類のペプチドが検出された（図 38）。ABA と AtTRXh3 の相互作用について詳細に調べるため、大腸菌を用いて組換え AtTRXh3 を作製した（図 39）。次に、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を用いて、組換え AtTRXh3 の検出を行った。その結果、ウェスタンブロッティング解析において AtTRXh3 に由来する化学発光シグナルが観察された（図 40）。また、AtTRXh3 とアジドプローブ **33** を反応させる際に、100 倍量の ABA (**29**) を同時に添加した場合、AtTRXh3 に由来する化学発光シグナルは著しく消失した（図 40）。この結果は、ABA (**29**) がアジドプローブ **33** の AtTRXh3 への結合を競争阻害したためであると考えられるため、ABA と組換え AtTRXh3 が結合することが示された。

AtTRXh3 は他のタンパク質のジスルフィド結合を還元切断することによりその活性調節を行うタンパク質である [52)]。Thioredoxin は、植物体内で光合成やストレス応答など多くのシグナル伝達の調節に関わっていると考えられている [53)]。例えば、シロイヌナズナにおいて、AtTRXh3 が高温耐性に関与していると報告されている [54)]。また、コムギ (Triticum aestivum)においては、TRXh が発芽を促進しているという報告もある [55)]。これらの報告から、シロイヌナズナにおいて ABA は AtTRXh3 の活性を抑制することで発芽阻害活性を示しているという仮説を立てられる。しかしながら、まだ推測の域を出ないため、ABA と AtTRXh3 の相互作用が生体内でどのような役割を持っているかは、シロイヌナズナの本遺伝子欠損株を用いた実験等により今後解明していく必要がある。

本研究では、生理活性化合物の新規な標的タンパク質検出法および同定法の設計を行い、既知の相互作用を対象としたモデル実験によりその有効性を確認した。さらに、本研究ではまだ未報告だった ABA 結合タンパク質を同定し、新規手法の有用性をさらに証明した。従って、開発した新規検出法および同定法が未知の標的タンパク質同定に利用されていくことが大いに期待される。

第 7 章　実験部

第 1 節　化合物の合成

第 1 項　使用した機器および担体

　核磁気共鳴スペクトル（NMR)、質量分析スペクトル（MS）の測定、実験に用いた機器および担体を以下に示す。

TLC:	Merck Silica gel 60 F_{254} (0.25 mm)
Silica gel:	Kanto Chemical; Silica gel 60N (spherical neutral) 63-210 μm
PTLC:	Silicagel 70 PF254 Plate-*Wako* (0.75 mm)
NMR:	JEOL JNM-EX 270 FT-NMR spectrometer
MS spectrum:	JEOL JMS-T100GCV mass spectrometer (FD/FI-MS)
Optical rotation:	JASCO P-2200 polarimeter

^{1}H NMR :	各試料の化学シフト値は重クロロホルム(δ 7.24)および重メタノール(δ 3.30)を内部基準としたときの δ 値（ppm）で示した。スピン結合定数は *J* 値（Hz）で示した。カップリングパターンは、singlet (s)、doublet(d)、triplet(t)、quartet(q)、multiplet(m)、broad(br.)と略した。
^{13}C NMR :	試料の化学シフト値は重クロロホルム（δ 77.0）および重メタノール（δ 49.0)を内部基準としたときの δ 値（ppm）で示した。
MS :	各試料の値は *m/z* で示した。
比旋光度：	波長 589 nm の D 発光線を用いて測定し、$[\alpha]_D$ 温度（10^{-1}degcm^2g^{-1})、濃度 *c* (g/dl)、使用した溶媒の順に示した。

第2項　合成

tert-Butyl {2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**3**)

2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxy]ethanol (**2**) (6.3 g, 37 mmol)、NaI (1.8 g, 12 mmol) および NaN_3 (3.9g, 60 mmol) を脱塩水 (40 ml) に溶解し、60℃で 16 時間撹拌した。反応液を EtOAc (60 ml × 5) で抽出した。得られた有機層に硫酸マグネシウムを加えて乾燥させ、濾過した後、減圧濃縮することで、アジド化合物 (6.5 g) を得た。

得られたアジド化合物 (6.5 g) を MeOH (20 ml) に溶解し、5% Pd-C (0.5 g) を加え水素雰囲気下、室温で 16 時間撹拌した。得られた混合溶液をセライトで濾過し、減圧濃縮してアミン化合物 (6.1 g) を得た。

得られたアミン化合物 (6.1 g) を CH_3CN (150 ml) に溶解し、脱塩水 (30 ml)、$(Boc)_2O$ (8.1 g,37 mmol) および 1M NaOH 水溶液 (30 ml) を加え、室温で 16 時間撹拌した。得られた溶液を減圧濃縮して溶媒を留去し、残渣に脱塩水を加えて EtOAc (100 ml × 3) で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (200 g, $CHCl_3$:MeOH =50:1) に供し、化合物 **3** (6.2 g, 25 mmol) を無色油状物質として、収率 68%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 5.21 (1H, br), 3.68 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.61-3.52 (6H, m), 3.50 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.24 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.88 (1H, br), 1.37 (s, 9H); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 155.9, 79.1, 72.5, 72.4, 70.2, 70.1, 61.5, 40.3, 28.2; FD-MS *m/z* (rel. int.): 250 (100, $[M+H]^+$), 249 (13.0, $[M]^+$), 57 (25.1), 31 (16.1); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{11}H_{24}NO_5$, 250.16545, found 250.16572.

tert-Butyl {2-[2-(2-bromoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**4**)

化合物 **3** (713 mg, 2.85 mmol), CBr_4 (1.23g, 3.70mmol) および K_2CO_3 (510mg, 3.70mmol) を CH_2Cl_2 (5ml) に溶解し、PPh_3 (1.20g, 4.56mmol) の CH_2Cl_2 (5ml) 溶液を 30 分かけて滴下し、室温で 16 時間撹拌した。減圧濃縮して得られた残渣に *n*-hexane を加え、濾過により PPh_3 酸化物を除去した。この *n*-hexane 溶液を減圧濃縮して得られた残渣

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（40 g, *n*-hexane:EtOAc=1:1）に供し、化合物 **4** (745 mg, 2.40 mmol) を油状物質として、収率 84%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 4.98 (1H, br), 3.76 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.63-3.55 (4H, m), 3.50 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.43 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.25 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.39 (s, 9H); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 155.8, 79.1, 71.0, 70.3, 70.1, 70.0, 40.2, 30.1, 28.3; FI-MS *m/z* (rel. int.): 314 (52.5), 313 (100), 312 (58.3, $[M+H]^+$), 311 (94.8, $[M]^+$), 57 (84.6); FI-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{11}H_{22}BrNO_4$, 311.07322, found 311.07016.

tert-Butyl {2-[2-(2-prop-2-ylethoxy)ethoxy]ethyl}carbamate (**6**)

窒素雰囲気下氷上で、NaH (480 mg,20 mmol) に 2-propyn-1-ol (**5**) (560 mg, 10 mmol) の THF (10 ml) 溶液をゆっくり加え、氷上にて 20 分間撹拌した。この溶液に化合物 **4** (488 mg,1.57 mmol) を加えて､氷上でさらに 2 時間撹拌した。NH_4Cl を加えて反応を停止させ、EtOAc (60 ml × 3) で抽出した。得られた有機層に硫酸マグネシウムを加えて乾燥させ、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g, *n*-hexane:EtOAc=3:2) に供し、化合物 **6** (90 mg, 0.31 mmol) を黄色油状物質として、収率 20%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 5.00 (1H, br), 4.18 (2H, d, *J*=3.0 Hz), 3.70-3.66 (4H, m),3.64-3.56 (4H, m), 3.50 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.28 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.40 (1H, t, *J*= 3.0 Hz), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 155.9, 79.5, 79.1, 74.5, 70.4, 70.3, 70.1, 70.1, 69.0, 58.3, 40.3, 28.3; FD-MS *m/z* (rel. int.): 288 (100, $[M+H]^+$), 287 (19.0, $[M]^+$), 69 (95.7), 57 (91.3); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{14}H_{26}NO_5$, 288.18110, found 288.18038.

2-[2-(2-Prop-2-ynyloxyethoxy)ethoxy]ethylamine (**7**)

化合物 **6** (90 mg, 0.31 mmol) に 50% TFA-CH_2Cl_2 (2 ml) を加え、0℃で 2 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、化合物 **7** (58 mg, 0.31 mmol)を黄色油状物質として、収率 99%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, CD_3OD): 4.80 (2H, s), 4.20 (2H, d, *J*=3.0 Hz), 3.68-3.56 (8H, m), 3.30 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.95 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.85 (1H, t, *J*=3.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CD_3OD): 80.5, 76.0, 71.4, 71.2, 71.2, 70.5, 70.0, 59.0, 41.3; FD-MS *m/z* (rel. int.): 188 (100, $[M+H]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_9H_{18}NO_3$, 188.12867, found 188.12836.

2-Amino-3-(4-benzoylphenyl)propanoic acid (**10**)

L-Phenylalanine (**8**) (40 mg, 0.24 mmol) に TfOH (1.0 ml) を加え、0℃で 1 時間撹拌した。その後、反応液に benzoyl chloride (**9**) (200 μl, 1.73 mmol) を加え、さらに室温で 16 時間撹拌した。脱塩水に反応液を注いだ後、EtOAc (60 ml×3) で抽出した。得られた有機層に硫酸マグネシウムを加えて乾燥させ、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, EtOAc:MeOH:H_2O=8:1:0.5) に供し、化合物 **10** (30 mg, 0.11 mmol) を黄色油状物質として、収率 46%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, DMSO): 7.76 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.68 (2H, m), 7.56 (1H, m), 7.44 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.24 (2H, m), 3.44 (1H, m), 3.15 (2H, m), 1.83 (2H, s); ^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO): 195.5, 170.2, 143.6, 137.2, 135.0, 132.5, 129.69, 129.64, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 128.4, 127.7, 65.9, 48.5; FD-MS *m/z* (rel. int.): 270 (83.1, $[M+H]^+$), 74 (100); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{16}H_{16}NO_3$, 270.11302, found 270.11038; $[\alpha]_D^{25}$ +19.0° (*c* 0.4, MeOH)

(+)-5-(2-Oxohexahydrothieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid (2-(4-benzoylphenyl)-1-{2-[2-(2-prop-2-ynyloxyethoxy)ethoxy]ethylcarbamoyl}ethyl)amide (**1**)

(+)-Biotin (**11**) (24.4 mg, 0.10 mmol)、EDC・HCl (19.1 mg, 0.10 mmol) および HOBt (13.5 mg, 0.10 mmol) を DMF (5 ml) に溶解し、室温で 1 時間撹拌した。反応液に化合物 **10** (20.0 mg, 0.09 mmol) を加えて、さらに 16 時間撹拌した(反応液 A)。

反応液 A に化合物 **7** (15.0 mg, 0.08 mmol) と EDC・HCl (19.1 mg, 0.10 mmol) を加えて、さらに 16 時間撹拌した。反応液に EtOAc を加え、1M HCl および $NaHCO_3$ で洗浄して、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲ

ルカラムクロマトグラフィー (20 g, $CHCl_3$:MeOH=9:1) に供し、化合物 **1** (11 mg, 0.017 mmol) を黄色油状物質として、収率 21%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.83 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.72 (2H, m), 7.60 (1H, m), 7.44 (2H, m), 7.21 (2H, m), 4.35 (1H, m), 4.15 (2H, m), 3.99 (2H, m), 3.63-3.46 (10H, m),3.42 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.16 (1H, m), 2.87 (2H, m), 2.68 (2H, m), 2.14 (1H, m), 2.05 (2H, m), 1.72 (2H, m), 1.50 (2H, m), 1.16 (2H, t, *J*=7.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 196.4, 179.9, 171.4, 142.2, 138.3, 133.8, 132.6, 130.8, 130.3, 130.1, 129.9, 129.6, 128.6, 128.3, 127.9, 81.8, 77.2, 76.2, 72.7, 72.1, 71.4, 70.7, 70.3, 64.8, 57.9, 57.5, 56.8, 55.2, 51.5, 44.6, 42.7, 33.6, 28.3, 27.9, 24.7; FD-MS *m/z* (rel. int.): 665 (100, $[M+H]^+$), 664 (52.1, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{35}H_{45}N_4O_7S$, 665.30089, found 665.29875; $[\alpha]_D^{25}$ +21.0° (*c* 0.4, MeOH)

Hexyl 8-bromooctanoate (**14**)

8-Bromooctanoic acid (**12**) (558 mg, 2.5 mmol)、1-hexanol (**13**) (256 mg, 2.5 mmol)、DCC (515 mg, 2.5 mmol) および DMAP (183 mg, 1.5 mmol) を十分乾燥させた後、乾燥 CH_2Cl_2 (8 ml) に溶解し、窒素雰囲気下、室温で 16 時間撹拌した。反応液に EtOAc を加え、1 M HCl、脱塩水および飽和食塩水で洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, *n*-hexane:EtOAc=19:1) に供し、化合物 **14** (606 mg, 1.98 mmol) を無色油状物質として、収率 79%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 4.02 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.36 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.26 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.82 (2H, tt, *J*=7.0, 7.0 Hz), 1.58 (4H, m), 1.32-1.27 (12H, m), 1.19 (3H, t, *J*=7.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.7, 64.4, 34.2, 33.8, 32.6, 31.3, 28.8, 28.5, 28.3, 27.9, 25.5, 24.8, 22.5, 13.9; EI-MS *m/z* (rel. int.): 309 (23.9), 307 (29.3, $[M+H]^+$), 84 (30.2), 29 (100); EI-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{14}H_{28}BrO_2$, 307.12727, found 307.12565.

Hexyl 8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**16**)

窒素雰囲気下、1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol (**15**) (103 mg, 0.40 mmol)および NaH (9.6 mg, 0.40 mmol) に室温で DMF (3 ml) をゆっくり加え、40℃で 1 時間撹拌した。反応溶液を－15℃に冷却し、DMF (5 ml) に溶解した化合物 **14** (122 mg, 0.40 mmol) を加え、室温で 2 時間撹拌した。反応液に EtOAc を加え、1M HCl、脱塩水および飽和食塩水で洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣を、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (20 g, $CHCl_3$:MeOH =19:1) に供し、化合物 **16** (83.0 mg, 0.17 mmol) を黄色油状物質として、収率 43%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.43 (1H, s), 7.39 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.23 (1H, s), 6.99 (1H, s), 6.90 (1H, s), 4.82 (1H, dd, *J*=6.0, 2,0 Hz), 4.13 (1H, dd, *J*=7.0, 2,0 Hz), 3.97 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.94 (2H, m), 3.34-3.15 (2H, m), 2.26 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.61-1.46 (8H, m), 1.28 (10H, m), 0.86 (3H, t, *J*=7.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.8, 137.7, 134.6, 134.5, 133.0, 129.3, 128.9, 128.3, 127.7, 119.7, 77.7, 70.0, 64.3, 51.3, 34.2, 31.3, 29.5, 28.9, 28.9, 28.5, 25.7, 25.5, 24.8, 22.4, 13.9; FD-MS *m/z* (rel. int.): 486 (17.4), 485 (33.3), 484 (75.3), 483 (50.5, $[M+H]^+$), 482 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{25}H_{36}Cl_2N_2O_3$, 482.21030, found 482.21035.

Methyl 8-bromooctanoate (**17**)

8-Bromooctanoic acid (**12**) (300mg, 1.35 mmol) の MeOH (20 ml) 溶液に、触媒量の濃硫酸を加え、3 時間 100℃で加熱還流した。反応液を Et_2O で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム、脱塩水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮し、化合物 **17** (319 mg, 1.35 mmol) を黄色油状物質として、収率 99%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 3.64 (3H, s), 3.38 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.28 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.83 (2H, dd, *J*=7.0, 7.0 Hz), 1.60 (2H, dd, *J*=7.0, 7.0 Hz), 1.52-1.28 (6H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 174.1, 51.4, 34.0, 33.8, 32.7, 28.9, 28.4, 28.0, 24.8; FI-MS *m/z* (rel. int.): 238 (64.3, $[M]^+$), 236 (61.8), 207 (39.2), 157 (100), 59 (8.66); FI-HR-MS *m/z*: calcd.

for $C_9H_{17}BrO_2$, 236.04119, found 236.03998.

Methyl 8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**18**)

窒素雰囲気下、室温で 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol (**15**) (392 mg, 1.53 mmol) と NaH (36.7 mg,1.53 mmol) に DMF (5 ml) をゆっくり加え、40℃で 1 時間撹拌した。反応液を－15℃に冷却し、DMF (5 ml) に溶解した化合物 **17** (360 mg, 1.53 mmol) を加え、室温で 1 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮した後、$CHCl_3$ を加え、脱塩水および飽和食塩水で洗浄した。有機層に硫酸マグネシウムを加えて乾燥した後、減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (35 g, $CHCl_3$:MeOH=19:1) に供し、化合物 **18** (312 mg, 0.76 mmol) を黄色油状物質として、収率 49%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.46 (1H, s), 7.39 (1H, s), 7.24 (1H, s), 7.23 (1H, s), 7.01 (1H, s), 6.91 (1H, s), 4.81 (1H, dd, *J*=6.0, 2.0 Hz), 4.15 (1H, dd, *J*=7.0, 2.0 Hz), 3.95 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.65 (3H, s), 3.37-3.15 (2H, m), 2.28 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.61-1.48 (4H, m), 1.26-1.23 (6H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 174.2, 137.8, 134.7, 134.6, 133.1, 129.5, 129.0, 128.4, 127.8, 119.8, 70.1, 51.5, 34.0, 29.6, 29.0, 28.9, 25.8, 24.8; FD-MS *m/z* (rel. int.): 417 (6.27), 416 (16.0), 415 (33.0), 414 (70.7), 413 (52.0, $[M+H]^+$), 412 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{20}H_{27}Cl_2N_2O_3$, 413.13987, found 413.13918.

8-[1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoic acid (**19**)

化合物 **18** (537mg, 1.30 mmol) に 1M NaOH (25 ml) と MeOH (25 ml) を加え、室温で 15 時間撹拌した。反応液に $CHCl_3$ を加え、1M HCl、脱塩水および飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g, $CHCl_3$:MeOH=9:1) に供し、化合物 **19** (377 mg, 0.94 mmol) を黄色油状物質として、収率 73%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 11.1 (1H, s), 7.60 (1H, s), 7.40 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.31 (1H, s), 7.01 (1H, s), 6.91 (1H, s), 4.81 (1H, dd, *J*=6.0, 2.0 Hz), 4.15 (1H, dd, *J*=7.0, 2.0

Hz), 3.95 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.43-3.10 (2H, m), 2.32 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.61-1.50 (4H, m), 1.26-1.18 (6H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 177.3, 137.5, 134.6, 134.4, 133.0, 129.5, 128.4, 127.8, 127.4, 119.9, 70.0, 51.6, 34.6, 29.4, 28.9, 28.8, 25.8, 24.9; FD-MS *m/z* (rel. int.): 403 (10.9), 402 (14.1), 401 (67.8), 400 (22.7), 399 (100, $[M+H]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{19}H_{25}Cl_2N_2O_3$, 399.12422, found 399.12547

6-(Tetrahydro-pyran-2-yloxy)hexan-1-ol (**20**)

1,6-Hexandiol (1.18g, 10 mmol) に PPTS (10 mg, 0.04 mmol) および 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (420 mg, 5.0 mmol) を加え、CH_2Cl_2 (40 ml) に溶解して、50℃で 3 時間撹拌した。反応液を $CHCl_3$ で希釈し、脱塩水および飽和食塩水で洗浄して、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (150 g, *n*-hexane:EtOAc=1:1) に供し、化合物 **20** (863 mg, 4.3 mmol) を無色油状物質として、収率 86%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 4.52 (1H, t, *J*=3.0 Hz), 3.86 (1H, m), 3.68 (1H, m), 3.65 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.45 (1H, m), 3.35 (1H, m), 2.04 (1H, s), 1.80-1.20 (14H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 98.8, 67.4, 62.6, 62.3, 32.6, 30.7, 29.6, 25.9, 25.5, 25.4, 19.6; FD-MS *m/z* (rel. int.): 203 (31.5, $[M+H]^+$), 202 (100, $[M]^+$), 184 (42.7), 85 (82.4), 31 (18.7); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{11}H_{22}O_3$, 202.15689, found 202.15586.

6-(Tetrahydropyran-2-yloxy)hexyl-8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**21**)

化合物 **19** (300 mg, 0.75 mmol) および化合物 **20** (152 mg, 0.75 mmol) に窒素雰囲気下、DCC (103 mg, 0.50 mmol) および DMAP (36.6 mg, 0.30 mmol) を加えた後、CH_2Cl_2 (10 ml) に溶解し、室温で 16 時間撹拌した。反応液に $CHCl_3$ を加え、脱塩水および飽和食塩水で洗浄して、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(40 g, $CHCl_3$:MeOH=19:1) に供し、化合物 **21** (424 mg, 0.73 mmol) を無色油状物質として、収率 97%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.40 (1H, s), 7.35 (1H, s), 7.23 (1H, s), 7.20 (1H, s), 6.95 (1H, s), 6.86 (1H, s), 4.75 (1H, dd, *J*=6.0, 2.0 Hz), 4.52 (1H, t, *J*=3.0 Hz), 4.10 (1H, dd, *J*=7.0, 2.0 Hz),3.95 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.90 (2H, m), 3.68 (2H, m), 3.43 (2H, m) 3.25 (2H, m), 2.32 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.81-1.40 (12H, m), 1.35-1.13 (12H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.7, 137.7, 134.6, 134.5, 133.0, 129.3, 128.9, 128.3, 127.7, 119.7, 98.8, 77.7, 70.0, 67.4, 64.2, 62.3, 51.3, 34.2, 30.7, 29.5, 29.5, 28.9, 28.9, 28.5, 25.8, 25.7, 25.4, 24.8, 24.7, 19.6; FD-MS *m/z* (rel. int.): 587 (13.6), 586 (24.8), 585 (66.7), 584 (65.9), 583 (100, $[M+H]^+$), 582 (54.7, $[M]^+$), 85 (38.5); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{30}H_{44}Cl_2N_2O_5$, 582.26273, found 582.26390.

6-Hydroxyhexyl 8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**22**)

1M HCl (20 ml) と MeOH (10 ml) を混合し、化合物 **21** (424 mg, 0.73 mmol) に加え、室温で 3 時間撹拌した。反応液に $CHCl_3$ を加え、飽和炭酸水素ナトリウム、脱塩水および飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (100 g, $CHCl_3$:MeOH=97:3) に供し、化合物 **22** (248 mg, 0.50 mmol) を白色固体粉末として、収率 68%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, CD_3OD): 7.56 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.34 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.07(1H, s), 6.93 (1H, s), 4.95 (1H, dd, *J*=6.0, 2.0 Hz), 4.31 (1H, dd, *J*=7.0, 2,0 Hz), 4.26 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 4.06 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.53 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.25 (2H, m), 2.32 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 2.00 (1H, s), 1.66-1.32 (10H, m), 1.20-1.08 (8H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CD_3OD): 175.5, 139.1, 136.4, 135.6, 134.6, 130.3, 130.1, 128.8, 128.6, 121.5, 78.7, 70.7, 65.4, 62.8, 52.2, 35.0, 33.5, 30.5, 30.0, 29.9, 29.7, 26.9, 26.5, 25.9, 23.5; FD-MS *m/z* (rel. int.): 503 (12.8), 502 (19.7), 501 (67.6), 500 (39.0), 499 (100, $[M+H]^+$), 498 (17.6, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{25}H_{37}Cl_2N_2O_4$, 499.21304, found 499.21216.

6-Tosylhexyl 8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**23**)

化合物 **22** (200 mg, 0.40 mmol) に窒素雰囲気下、塩化トシル (114 mg, 0.60 mmol)、TEA

(1 ml)、DMAP (12.2 mg, 0.10 mmol) を加え、乾燥 CH_2Cl_2 (10 ml) に溶解し、室温で 16 時間撹拌した。反応液に $CHCl_3$ を加え、1M HCl、脱塩水および飽和食塩水で洗浄して、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, $CHCl_3$:MeOH=99:1) に供し、化合物 **23** (166 mg, 0.25 mmol) を黄色油状物質として、収率 64%で得た。

^1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.77 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.45 (1H, s), 7.38 (1H, s), 7.33 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.23 (1H, s), 7.12 (1H, s), 7.00 (1H, s), 6.90 (1H,s), 4.81 (1H, dd, *J*=6.0, 2,0 Hz), 4.16 (1H, dd, *J*=7.0, 2.0 Hz), 4.06 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.99-3.81 (2H, m), 3.45 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.34-3.14 (2H, m), 2.42 (3H,s), 2.25 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.78-1.50 (10H, m), 1.30-1.18 (8H, m); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.7, 144.6, 143.8, 134.6, 134.5, 133.1, 133.0, 129.7, 129.4, 128.9, 128.8, 128.5, 128.3, 127.8, 127.7, 119.8, 77.7, 70.3, 70.0, 64.0, 51.4, 34.2, 29.5, 28.9, 28.9, 28.7, 28.4, 25.8, 25.3, 25.0, 24.8, 21.6; FD-MS *m/z* (rel. int.): 657 (19.3), 656 (30.7), 655 (78.5), 654 (57.6), 653 (100, $[M+H]^+$), 652 (30.3, $[M]^+$), 481 (37.5); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{32}H_{43}Cl_2N_2O_6S$, 653.22189, found 653.22303.

6-Azidohexyl 8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazolylethoxy]octanoate (**24**)

化合物 **23** (70 mg, 0.11 mmol) および NaN_3 (26 mg, 0.40 mmol) を DMF (8 ml) に溶解し、100℃で 16 時間撹拌した。反応液に $CHCl_3$ を加え、脱塩水および飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, $CHCl_3$:EtOAc=9:1) に供し、化合物 **24** (43 mg, 0.082 mmol) を黄色油状物質として、収率 77%で得た。

^1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.42 (1H, s), 7.38 (1H, s), 7.27 (1H, s), 7.25 (1H, s), 6.96 (1H, s),6.90 (1H, s), 4.76 (1H, dd, *J*=6.0, 2,0 Hz), 4.10 (1H, dd, *J*=7.0, 2,0 Hz), 3.95 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz), 3.92-3.85 (2H, m), 3.40 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.31-3.10 (2H, m), 2.23 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 1.60-1.42 (10H, m), 1.34-1.08 (8H, m) ; ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.8, 137.9, 134.7, 134.6, 133.1, 129.4, 128.9, 128.4, 127.7, 119.8, 77.7, 70.0, 64.1, 51.4, 51.3, 34.2, 29.5, 29.0, 28.9, 28.7, 28.5, 26.3, 25.8, 25.5, 24.8; FD-MS *m/z* (rel. int.): 528 (12.9),

527 (19.4), 526 (66.6), 525 (35.9), 524 (100, [M+H]+), 523 (9.99, [M]+); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{25}H_{36}Cl_2N_5O_3$, 524.21952, found 524.22179.

(+)-(5-[5-(2-Oxohexahydrothieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoylamino]-5-{2-[2-(2-prop-2-ynyloxyethoxy)ethoxy]ethylcarbamoyl}pentyl)carbamic acid *tert*-butyl ester (**28**)

(+)-Biotin (**11**) (122 mg, 0.50 mmol)、EDC・HCl (95.5 mg, 0.50 mmol) および HOBt (67.5 mg, 0.50 mmol) を DMF (5 ml) に溶解し、室温で 1 時間撹拌した。反応液に *N*ε-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysine (**27**) (98.4 mg, 0.40 mmol) を加えて、さらに 16 時間撹拌した (反応液 A)。反応液 A に化合物 **7** (74.8 mg, 0.40 mmol) と EDC・HCl (95.5 mg, 0.40 mmol) を加えて、さらに 16 時間撹拌した。反応液に EtOAc を加え、1M HCl および $NaHCO_3$ で洗浄して、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g, $CHCl_3$:MeOH=9:1) に供し、化合物 **28** (75 mg, 0.117 mmol) を黄色油状物質として、収率 29%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 4.45 (1H, m), 4.28 (2H, m), 4.13 (2H, d, *J*=3.0 Hz), 3.68-3.57 (10H, m), 3.49-3.34 (3H, m), 3.02-2.64 (4H, m), 2.45 (1H, t, *J*=3.0 Hz), 2.16 (2H, m), 1.65-1.45 (8H, m), 1.37 (9H, s), 1.17 (4H, t, *J*=7.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 173.5, 171.9, 164.2, 156.1, 79.4, 78.8, 74.7, 70.4, 70.1, 70.0, 69.4, 68.9, 60.1, 58.2, 58.1, 55.7, 50.4, 40.3, 40.1, 39.1, 35.3, 31.6, 29.3, 28.3, 27.9, 25.3, 22.6, 18.2; FD-MS *m/z* (rel. int.): 642 (93.3, [M+H]+); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{30}H_{52}N_5O_8S$, 642.35366, found 642.35552; $[\alpha]_D^{25}$ +2.6° (*c* 1.4, MeOH)

6-Amino-2-[5-(2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoylamino]hexznoic acid {2-[2-(2-prop-2-ynyloxyethoxyl)ethoxy]ethyl}amide (**26**)

化合物 **28** (16.7 mg, 0.026 mmol) に、50% TFA- CH_2Cl_2 溶液を加え、0℃で 2 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、化合物 **26** (16 mg, 0.026 mmol) を黄色油状物質として、収率 99%で得た。

^1H NMR (270 MHz, CD_3OD): 4.83 (2H, s), 4.49 (1H, m), 4.31 (2H, m), 4.19 (2H, d, *J*=3.0 Hz), 3.71-3.52 (10H, m), 3.37-3.20 (3H, m), 2.93 (2H, m), 2.72 (2H, m), 2.24 (1H, t, *J*=3.0 Hz), 2.00 (2H, m), 1.77-1.56 (4H, m), 1.55-1.34 (4H, m),1.16 (4H, t, *J*=7.0 Hz); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CD_3OD): 176.0, 174.2, 166.1, 80.5, 76.1, 76.0, 71.5, 71.2, 71.1, 70.0, 61.6, 59.0, 58.3, 57.0, 57.0, 41.0, 40.4, 40.3, 36.3, 32.5, 29.5, 28.1, 26.6, 23.6, 18.3; FD-MS *m/z* (rel. int.): 559 (93.5, $[M+H_2O]^+$), 542 (30.7, $[M+H]^+$), 344 (100); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{25}H_{44}N_5O_6S$, 542.30123, found 542.30304; $[\alpha]_D^{25}$ +1.3°（*c* 0.5, MeOH）

Methyl [*S*-(*Z,E*)]-5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexenyl)-3-methylpent-2,4-dienoate（**30**）

化合物 **29** (45 mg, 0.17 mmol）の MeOH (5 ml）溶液に、CH_2N_2溶液を過剰量加え、0℃で 5 分間攪拌した。CH_2N_2が呈する黄色が完全に消えるまで反応液に AcOH を加えた。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（15 g, *n*-hexane:EtOAc=7:3）に供し、化合物 **30** (51 mg, 0.17 mmol）を無色油状物質として、収率 99%で得た。

^1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.84 (1H, d, *J*=16,0 Hz), 6.14 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 5.92 (1H, s), 5.73 (1H, s), 3.68 (3H, s), 2.45 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 2.26 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 1.98 (3H, s), 1.90 (3H, s), 1.62 (1H, br), 1.09 (3H, s), 0.99 (3H, s); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 197.7, 166.3, 162.4, 149.3, 136.3, 128.0, 126.9, 118.1, 79.6, 51.1, 49.7, 41.4, 24.2, 23.0, 21.1, 18.8; FD-MS *m/z* (rel. int.): 278 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{16}H_{22}O_4$, 278.15181, found 278.15341.

Methyl [*S*-(*Z,E*)]-5-(2-hydroxy-1,3,3 -trimethyl-5-oxo-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-yl)-3-methylpent-2,4-dienoate（**31**）

化合物 **30** (45 mg, 0.16 mmol）の DMSO (3 ml）溶液に、窒素雰囲気下、30% H_2O_2 (200 μl）および tetrabutylammonium fluoride (1 ml）を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液に脱塩水を加え、EtOAc (60 ml × 3）で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、

減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（10 g, *n*-hexane:EtOAc=7:3）に供し、化合物 **31** (19 mg, 0.065 mmol) を無色油状物質として、収率 40%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 8.04 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 6.04 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 5.74 (1H, s), 3.70 (3H, s), 3.26 (1H, s), 2.81 (1H, d, *J*=14.0 Hz), 2.00 (3H, s), 1.80 (1H, s, *J*=14.0 Hz), 1.57 (1H, br), 1.36 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.90 (3H, s); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 205.5, 166.3, 149.1, 134.4, 128.8, 118.1, 77.1, 76.2, 68.9, 64.2, 51.1, 46.0, 44.2, 24.7, 23.9, 21.0; FD-MS *m/z* (rel. int.): 294 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{16}H_{22}O_5$, 294.14672, found 294.14795.

Methyl [*S*-(*Z,E*)]-5-(3-azide-1-hydroxy-2,6,6 -trimethyl-4-oxo-2-cyclohexenyl)-3-methyl pent-2,4-dienoate (**32**)

化合物 **31** (18 mg, 0.060 mmol)、NaN_3 (20 mg, 0.30 mmol) および NH_4Cl (10 mg, 0.18 mmol) を DMF (3 ml) に溶解し、80℃で 3 時間撹拌した。反応液に EtOAc を加え、1M HCl および飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（10 g, *n*-hexane:EtOAc=8:2）に供し、化合物 **32** (8 mg, 0.025 mmol) を黄色油状物質として、収率 42%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.82 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 6.05 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 5.73 (1H, s), 3.60 (3H, s), 2.51 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 2.41 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 1.98 (3H, s), 1.84 (3H, s), 1.56 (1H, br), 1.09 (3H, s), 0.99 (3H, s); ^{13}C NMR (67.8 MHz, $CDCl_3$): 192.2, 169.4, 166.4, 149.1, 135.6, 131.3, 128.3, 118.4, 79.5, 51.2, 49.0, 41.0, 24.2, 23.0, 21.1, 14.2; FD-MS *m/z* (rel. int.): 319 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{16}H_{21}N_3O_4$, 319.15321, found 319.15408.

[*S*-(*Z,E*)]-5-(3-azide-1-hydroxy-2,6,6 -trimethyl-4-oxo-2-cyclohexenyl)-3-methylpent-2,4-dienoic acid (**33**)

化合物 **32** (8 mg, 0.025 mmol) および Esterase from porcine liver (Sigma) を MeOH (1.5 ml) および 0.1 M リン酸緩衝液（pH 8.0, 8 ml）に溶解し、25℃で 48 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl を加え、EtOAc (60 ml×3) で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（10 g, *n*-hexane:EtOAc:AcOH=70:30:1）に供し、化合物 **33** (4 mg, 0.013 mmol) を黄色油状物質として、収率 52%で得た。

^{1}H NMR (270 MHz, $CDCl_3$): 7.76 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 6.08 (1H, d, *J*=16.0 Hz), 5.76 (1H, s), 2.47 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 2.37 (1H, d, *J*=17.0 Hz), 2.02 (3H, s), 1.84 (3H, s), 1.56 (1H, br), 1.09 (3H, s), 1.00 (3H, s); FD-MS *m/z* (rel. int.): 305 (100, $[M]^+$); FD-HR-MS *m/z*: calcd. for $C_{15}H_{19}N_3O_4$, 305.13756, found 305.13664.

第 2 節　生化学実験における基本操作

第 1 項　使用した機器

実験に用いた機器、担体を以下に示す。

電気泳動槽：Bio-rad Laboratories ミニプロティアン SD セル
分光光度計：Hitachi U-2800 Spectrophotometer

第 2 項　タンパク質濃度の測定

タンパク質溶液（100 µl）に Bradford 試薬（1 ml）を加え、攪拌した。5 分間の静置後、分光光度計を用いて 595 nm の吸光度を測定した。標準タンパク質として BSA 溶液（0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/ml）を用いて検量線を作成し、タンパク質濃度を算出した。

第3項　SDS-PAGE

試料に 4× sample buffer（0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 20% 2-mercaptoethanol）を1倍となるように加えて3分間煮沸し、電気泳動用試料とした。電気泳動緩衝液として、10× running buffer（250 mM Tris base, 1.92 M glycine, 1% SDS）を10倍希釈して用いた。濃縮ゲルのポリアクリルアミド濃度は4%、分離ゲルのポリアクリルアミド濃度は10%、15%もしくは17%とした。タンパク質の分子量マーカーとしてXL-Ladder broad（アプロサイエンス）を用いた。定電圧200Vの条件でbromophenol blue由来の青色のバンドがゲルの下端に達するまで電気泳動を行った。

第4項　CBB染色

特に断らない限りタンパク質の染色にはCBB染色液（2.5 g/l coomassie brilliant blue R-250, 50% MeOH, 10% AcOH）を用いた。電気泳動後の分離ゲルをCBB染色液に浸し5分間静置した。染色したゲルは脱色液（50% MeOH, 10% AcOH）を用いて脱色した。

第5項　銀染色

銀染色には、銀染色IIキット ワコー（富士フィルム和光純薬）を用い、記載されている方法に従って行った。染色に用いる溶液は25℃に調整した。

第3節　遺伝子実験における基本操作

第1項　使用した機器

実験に用いた機器を以下に示す。

遠心分離機：日立工機 himac CT15RE
TOMY SRX-200

第 2 項　大腸菌用培地組成

大腸菌の培養に用いた培地組成を以下に示す。トリプトンおよび乾燥酵母エキスは微生物培養用のものを用いた。

LB 培地 : 10 g/L トリプトン（ナカライテスク）、5 g/L 乾燥酵母エキス（ナカライテスク）、5 g/L NaCl

SOB 培地 : 20 g/L トリプトン（ナカライテスク）、5 g/L 乾燥酵母エキス（ナカライテスク）、0.5 g/L NaCl、2.5 mM KCl、10 mM $MgCl_2$

第 3 項　アガロースゲル電気泳動

DNA 溶液に 10× Loading buffer (Takara) を加え、電気泳動に供した。電気泳動は TAE バッファー（40 mM Tris, 40 mM AcOH, 1 mM EDTA）を泳動バッファーとして使用し、ゲルは TAE バッファーと Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics) を含む 1.0%アガロースを使用した。DNA の分子量マーカーとして ExcelBand DNA Ladder (SMOBIO) を用いた。電気泳動後のゲル中の DNA はトランスイルミネーター（FAS-DIGI, NIPPON Genetics）により検出した。

第 4 項　アガロースゲルからの DNA 抽出

電気泳動後のアガロースゲルから目的の DNA 長と一致するバンドを切り出し、マイクロチューブに移した。液体窒素により凍結させたあと、室温下で融解させた。得られた上清を回収し、DNA 溶液とした。

第 5 項　制限酵素処理

制限酵素反応には Takara 社の制限酵素を用いた。制限酵素反応は記載されているプロトコールに従って行った。

第 6 項　ライゲーション反応

ライゲーション反応には Ligation Mix (Takara) を用いた。反応は、16℃で 30 分行った。反応液組成を以下に示す。

・反応液組成

Ligation Mix	4 µl
Vector DNA	1 µl
Insert DNA	3 µl
全量	8 µl

第 7 項　In-Fusion クローニング

In-Fusion クローニングには In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いた。反応は、50℃で 15 分行った。反応液組成を以下に示す。

・反応液組成

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl
Vector DNA	2 µl
Insert DNA	2 µl
滅菌水	4 µl
全量	10 µl

第 8 項　大腸菌コンピテントセルの作製

大腸菌を LB 寒天培地で培養した後、形成したコロニーを LB 液体培地 5 mL に植菌して、前培養した。1 mL の前培養液を 20 mL の SOB 液体培地に加え、培養液の OD_{600} が 0.55 付近を示すまで 37℃で振盪培養した。本培養液を 50 mL のプラスチックチューブに移し、遠心分離（2500 rpm, 10 min, 4˚C）を行い、上清を除去して菌体を得た。本菌体に、氷冷した 16 mL の transformation buffer (550 mM $MnCl_2$・$4H_2O$, 150 mM $CaCl_2$・H_2O,

2.5 M KCl, 100 mM PIPES, pH 6.7）を加えて、穏やかに懸濁し、遠心分離（2500 rpm, 10 min, 4˚C）を行った。再び上清を除去した後、氷冷した 4 mL の transformation buffer を加えて穏やかに懸濁させ、300 µL の DMSO を添加し、氷上で 10 分間静置した。本大腸菌溶液を 50 µL ずつ 1.5 mL のマイクロチューブに分注し、液体窒素を用いて速やかに凍結した。調製したコンピテントセルは－80℃で保存した。

第 9 項　大腸菌の形質転換

氷上で溶解させた大腸菌のコンピテントセル（50 µl）にライゲーション反応液もしくはプラスミド DNA（10 µg/ml 程度に希釈）を加え、穏やかに混ぜた後、氷上で 30 分静置した。コンピテントセル溶液をヒートショック処理（42℃, 1 分）した後、氷上で 5 分ほど静置した。抗生物質添加 LB 寒天培地に本大腸菌溶液 25 µl を播種し、37℃で培養することで形質転換された菌株を得た。ただし、kanamycin を抗生物質として用いた場合は、ヒートショック後の大腸菌溶液に 1 ml の LB 液体培地を加え、37℃で 1 時間インキュベートし、本培養液 100 µl を LB 寒天培地に播種した。

また、ベクターとして pBluescript SK II (+) を用いる場合は、ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 寒天培地にあらかじめ 100 mM IPTG (50 µl) および 20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (X-Gal) (50 µl) を塗布し、大腸菌を播種した。37℃での培養後、白色のコロニーを選択的に採取した。

第 10 項　コロニーPCR

コロニーPCR には GoTaq Green Master Mixes (Promega) を用いた。PCR 溶液の組成および PCR 条件は以下に示す。プレート上のコロニーを滅菌した爪楊枝で採取し、PCR 溶液に懸濁させ反応液とした。PCR 反応における伸長時間は PCR 産物の鎖長によって適宜調節した（1000 bp/分）。

・PCR 溶液組成

GoTaq® Green Master Mix, 2X	6.25 µl
5 µM Forward プライマー	0.5 µl
5 µM Reverse プライマー	0.5 µl
滅菌水	5.25 µl
全量	12.5 µl

・PCR 条件

95℃	2 分	
95℃	10 秒	30 サイクル
51℃	30 秒	30 サイクル
72℃	適宜	30 サイクル
72℃	10 分	
4℃	∞	

第 11 項　プラスミド抽出

37℃で一晩振盪培養した大腸菌培養液 2 ml をマイクロチューブに移し、遠心分離（15000 rpm, 3 分, 4℃）を行った後、上清を取り除いた。沈殿を 200 µl の Sol.1 [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 50 mM glucose] で懸濁し、400 µl の Sol.2 (200 mM NaOH, 1% SDS) を加え、転倒混和した後に、氷上で 5 分静置した。300 µl の Sol.3 [3M KOAc (pH 4.8)] を加え、転倒混和した後、氷上で 10 分静置した。遠心分離（15000 rpm, 15 分, 4℃）を行い、上清を新しいマイクロチューブに移した後、600 µl の 2-プロパノールを加え、氷上で 10 分静置した。遠心分離（15000 rpm, 10 分, 4℃）を行い、上清を廃棄した後、600 µl の 70%エタノール水溶液を加え、再度遠心分離（15000 rpm, 10 分, 4℃）を行った。上清を捨て、沈殿を乾燥させた後、100 µl の 20 µg/ml Ribonuclease (DNase free) (Nippon Gene) を加えて 37℃で 30 分インキュベートした。その後、30 µl の 1 M 塩化マグネシウムを加え、10 分間氷上で静置した。再度遠心分離（15000 rpm, 10 分, 4℃）を行った後、上清を新しいマイクロチューブに移し、130 µl の 2-プロパノールを加え、氷上で 10 分静置した。遠心分離（15000 rpm, 15 分, 4℃）を行い、上清を廃棄した後、130 µl の 70%エタノール水溶

液を加え、再度遠心分離（15000 rpm, 15 分, 4℃）を行った。上清を捨て、沈殿を乾燥させた後、100 µl の滅菌水に溶解させた。

第 12 項　塩基配列解析

塩基配列解析における PCR 反応は BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) を用いて行った。反応溶液の組成および PCR 条件は以下に示す。反応液に 25 µl のエタノールと 1 µl の 3M 酢酸ナトリウム水溶液を加え、常温暗所で 10 分静置した。遠心分離（15000 rpm, 20 分, 20℃)を行った後、上清を取り除き、1 ml の 70%エタノール水溶液を加え、再度遠心分離（15000 rpm, 10 分, 20℃）した。沈殿として得られた DNA を乾燥させた後、20 µl の Hi-Di Formamide (ThermoFisher) を加え、100℃で 2 分間処理した。塩基配列は 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で分析した。

・反応液組成

5X Sequencing Buffer	2 µl
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0.5 µl
1.6 µM プライマー	1 µl
Template DNA	1 µl
滅菌水	5.5 µl
全量	10 µl

第 4 節　組換えタンパク質の発現

第 1 項　使用した機器

実験に用いた機器を以下に示す。

遠心分離機：日立工機 himac CT15RE

TOMY SRX-200

第 2 項　組換え AtPYL2 の作製

Takeuchi らの方法に従い、*AtPYL2* 遺伝子をクローニングし、AtPYL2 をタンパク質過剰発現用ベクターpET28 に挿入した [56]。得られたプラスミド pET28-AtPYL2 を大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、kanamycin (50 µg/ml) 添加 LB 寒天培地に播種して 37℃で一晩培養した。得られた形質転換大腸菌は、kanamycin (50 µg/ml) を含む LB 培地 5 ml×2 本に植菌し、37℃で一晩振盪培養した(125 rpm)。この前培養液を、kanamycin (50 µg/ml) を含む LB 培地 1 L に加え、37℃で振盪培養した(125 rpm)。培養液の OD_{600} が 0.5～0.6 になった時点で 1 M IPTG を 200 µl を加え、さらに 15℃で一晩振盪培養した (125 rpm)。その後、遠心分離 (5000 *g*, 10 min, 4℃) を行い、菌体を回収した。菌体を 30 ml の sonication buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) に懸濁し、超音波破砕機で細胞を破砕処理した。遠心分離 (12000 rpm, 10 min, 4℃) を行い、可溶性画分として上清を得た。得られた上清をニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した。担体は Ni-NTA agarose (GE healthcare) を用いた。予め平衡化 buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) で平衡化した担体に試料を供した後、同バッファーで洗浄して非吸着タンパク質を溶出した。その後、溶出 buffer (50 mM sodiumphosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole) で組換えタンパク質の溶出を行った。精製後の画分を SDS-PAGE に供し、タンパク質のバンドを確認した。目的バンドが確認された画分を回収して透析 buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 100 mM NaCl) を用いて 3 時間の透析を行った後、新しい透析 buffer を用いてさらに一晩透析を行った。本操作により組換え AtPYL2 を得た。

第 3 項　組換え PpAOS1 の作製

Bandara らの方法に従い、*PpAOS1* 遺伝子をクローニングし、PpAOS1 をタンパク質過剰発現用ベクターpET23a に挿入した [34]。得られたプラスミド pET23a-PpAOS1 を大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、ampicillin (100 µg/ml) 添加 LB 寒天培地に播種して 37℃で一晩培養した。得られた形質転換大腸菌は、ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 培地 5 ml×2 本に植菌し、37℃で一晩振盪培養した(125 rpm)。この前培養液を、ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 培地 1 L に加え、37℃で振盪培養した(125 rpm)。培養液の OD_{600} が 0.5

～0.6 になった時点で 1 M IPTG を 200 µl を加え、さらに 15℃で一晩振盪培養した（125 rpm)。その後、遠心分離（5000 *g*, 10 min, 4℃）を行い、菌体を回収した。菌体を 30 ml の sonication buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) に懸濁し、超音波破砕機で細胞を破砕処理した。これを遠心分離（12000 rpm, 10 min, 4℃）を行い、可溶性画分として上清を得た。組換え PpAOS1 の精製は、第 4 節第 2 項に記載した方法に従って行った。

第 4 項　組換え PpAOC2 の作製

Bandara らの方法に従い、PpAOC2 をクローニングし、PpAOC2 をタンパク質過剰発現用ベクターに挿入した [34]。得られたプラスミド pQE30-PpAOC2 を大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、ampicillin (100 µg/ml) 添加 LB 寒天培地に播種して 37℃で一晩培養した。得られた形質転換大腸菌は、ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 培地 5 ml×2 本に植菌し、37℃で一晩振盪培養した(125 rpm)。この前培養液を、ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 培地 1 L に加え、37℃で振盪培養した(125 rpm)。培養液の OD_{600} が 0.5～0.6 になった時点で 1 M IPTG を 200 µl を加え、さらに 15℃で一晩振盪培養した（125 rpm)。その後、遠心分離（5000 g, 10 min, 4℃）を行い、菌体を回収した。菌体を sonication buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) に懸濁し、超音波破砕機で細胞を破砕処理した。遠心分離（12000 rpm, 10 min, 4℃）を行い、可溶性画分として上清を得た。組換え PpAOC2 の精製は、第 4 節第 2 項に記載した方法に従って行った。

第 5 項　組換え AtTRXh3 の作製

長田の方法 [57]に従ってシロイヌナズナから作製された cDNA を鋳型とし、thio_F および thio_R のプライマーを用いて PCR 反応を行った。反応液組成および PCR 条件を以下に示す。

・反応液組成

KOD ONE PCR Master Mix （東洋紡）	25 µl
10 µM thio_F プライマー	1.5 µl
10 µM thio_R プライマー	1.5 µl
cDNA	1.0 µl
滅菌水	21 µl
全量	50 µl

・PCR 条件

94℃ 2 分

98℃ 10 秒 ⎤
45℃ 5 秒 ⎬ 40 サイクル
68℃ 5 秒 ⎦

4℃ ∞

PCR 反応液はそれぞれアガロースゲル電気泳動を行い、目的の DNA 長（357 bp）と一致するバンドを切り出し、DNA を抽出した。得られた DNA 溶液をライゲーション反応により、EcoRV で制限酵素処理した pBluescript SK II (+) ベクターに導入した。得られたプラスミドで大腸菌 DH5α 株を形質転換し、SK T7-30 および SK T3-46 のプライマーを用いてコロニーPCR を行った。形質転換された菌株からプラスミドを抽出し、pSK-AtTRXh3 を得た。得られたプラスミドは SK T3-46 のプライマーを用いて塩基配列解析を行い、遺伝子配列にエラーがないことを確認した。

pSK-AtTRXh3 を鋳型とし、thio_F_Nde1_infusion と thio_R_BamH1_infusion のプライマーを用いて PCR 反応を行った。反応液組成および PCR 条件を以下に示す。

・反応液組成

KOD ONE PCR Master Mix （東洋紡）	25 µl
10 µM thio_F_Nde1_infusion プライマー	1.5 µl
10 µM thio_R_BamH1_infusion プライマー	1.5 µl
cDNA	1.0 µl
滅菌水	21 µl
全量	50 µl

・PCR 条件

94℃	2 分	
98℃	10 秒	40 サイクル
59℃	5 秒	40 サイクル
68℃	7 秒	40 サイクル
4℃	∞	

PCR 反応液はそれぞれアガロースゲル電気泳動を行い、目的の DNA 長（386 bp）と一致するバンドを切り出し、DNA を抽出した。得られた PCR 反応産物と、Nde1 および BamH1 の制限酵素で処理した pET23a ベクターに対し、In-Fusion クローニングを行った。得られたプラスミドで大腸菌 DH5α 株を形質転換し、T7 promoter および T7 terminator のプライマーを用いてコロニーPCR を行った。形質転換された菌株からプラスミドを抽出し、pET23a-AtTRXh3 を得た。pET23a-AtTRXh3 で大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、組換え AtTRXh3 を過剰発現する大腸菌形質転換株が得られた。この株を ampicillin (100 µg/ml) を含む LB 培地 5 ml×2 本に植菌し、37℃で一晩振盪培養した（125 rpm）。この前培養液を、ampicillin (100 µl/ml) を含む LB 培地 1 L に加え、25℃で振盪培養した（125 rpm）。培養液の OD600 が 0.5～0.6 になった時点で 1 M IPTG を 200 µl を加え、さらに 25℃で 3 時間振盪培養した（125 rpm）。その後、遠心分離（5000 g, 10 min, 4℃）を行い、菌体を回収した。菌体を sonication buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) に懸濁し、超音波破砕機で細胞を破砕処理した。遠心分離（12000 rpm, 10 min, 4℃）を行い、可溶性画分として上清を得た。組換え AtTRXh3 の精製は、第 4 節第 2 項に記載した方法に従って行った。

第 6 項　使用したプライマーの配列

本研究で使用したプライマーの配列を以下に示す。

thio_F	5'-ATGGCCGCAGAAGGAGAAG-3'
thio_R	5'-TCAAGCAGCAGCAACAACT-3'
thio_F_Nde1_infusion	5'-AAGGAGATATACATATGGCCGCAGAAGGAGAAG-3'
thio_R_BamH1_infusion	5'-GCTCGAATTCGGATCAGCAGCAGCAACAACTGTC-3'
SK T7-30	5'-CGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'
SK T3-46	5'-CAATTTCACACAGGAAACAGC-3'
T7 promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

第 5 節　PpAOS1 のアフィニティーラベル化

特に断らない限り、操作はすべて氷上で行った。

第 1 項　リンカー**1** を用いる手法（光反応基を用いる手法）

組換え PpAOS1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 μM, 56 μl) にアジドプローブ **24** (MeOH, 最終濃度 30 μM, 2 μl) を加え、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**1** (MeOH, 最終濃度 30 μM, 2 μl) と CuI (最終濃度 0.5 μM) を加え、さらに 1 時間インキュベートした。遠心分離により不溶性の CuI を除去した後、360 nm の紫外線（15 W, 10 cm from samples）を 1 時間照射し、架橋反応を行わせた。本反応液 30 μl をウェスタンブロッティング解析に供し、検出を行った。対照として紫外線を照射しない反応液も同じ条件で反応を行った。また、PpAOC2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 μM, 56 μl) の検出においても同じ条件で反応を行った。

第 2 項　化学発光シグナルに対する PpAOS1 の濃度依存性

組換え PpAOS1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 56 µl) の濃度を 1.25 µM から 10.0 µM の各濃度に調整し、アジドプローブ **24** (MeOH, 最終濃度 30 µM, 2 µl) を加え、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 5 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **24** の濃度依存性

組換え PpAOS1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 56 µl) に、最終濃度がそれぞれ 3 nM, 30 nM, 300 nM, 3000 nM となるようにアジドプローブ **24** (MeOH, 2 µl) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 5 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 4 項　アジドプローブ **24** の有効性の確認

・あらかじめアジドプローブ **24** とリンカー**1** を結合させる場合

アジドプローブ **24** (MeOH, 500 µM)、リンカー**1** (MeOH, 500 µM) および CuI (最終濃度 0.5 µM)を 1 時間インキュベートした。本溶液 (4 µl) を組換え PpAOS1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 56 µl) に添加し、さらに 1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 5 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

・過剰量の AOS 阻害剤 **16** を添加する場合

組換え PpAOS1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 56 µl) にアジドプローブ **24** (MeOH, 最終濃度 30 µM, 2 µl) および AOS 阻害剤 **16** (MeOH, 最終濃度 300 µM, 2 µl) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 5 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 5 項　大腸菌粗酵素液中の PpAOS1 の検出

組換え PpAOS1 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.50 mg/ml）にアジドプローブ **24**（MeOH, 最終濃度 30 μM, 2 μl）を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 5 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 6 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法）

組換え PpAOS1（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 μM, 56 μl）にアジドプローブ **24**（MeOH, 最終濃度 30 μM, 2 μl）を加え、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**26**（MeOH, 最終濃度 300 nM, 2 μl）と CuI（H_2O, 最終濃度 0.80 μM, 2 μl）を加え、さらに 1 時間インキュベートした。その後、タンパク質架橋剤 BS3 (**25**)（H_2O, 最終濃度 30 μM, 2 μl）を加え、1 時間インキュベートし、架橋反応を行わせた。本反応液 30 μl をウェスタンブロッティング解析に供し、検出を行った。

第 6 節　AtPYL2 のアフィニティーラベル化

特に断らない限り、操作はすべて氷上で行った。

第 1 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法）

組換え AtPYL2（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 μM, 40 μl）にアジドプローブ **33**（MeOH, 最終濃度 40 μM, 2 μl）を加え、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**26**（MeOH, 最終濃度 40 μM, 2 μl）と CuI（H_2O, 最終濃度 0.80 μM, 2 μl）を加え、さらに 1 時間インキュベートした。タンパク質架橋剤 BS3 (**25**)（H_2O, 最終濃度 40 μM, 2 μl）を加え、1 時間インキュベートし、架橋反応を行わせた。本反応液 30 μl をウェスタンブロッティング解析に供し、検出を行った。対照として BS3 を添加しない反応液も同じ条件で反応を行った。また、PpAOC2（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 μM, 40 μl）の検出においても同じ条件で反応を行っ

た。

第 2 項　化学発光シグナルに対する AtPYL2 の濃度依存性

組換え AtPYL2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 40 µl) の濃度を 1.3 µM から 10 µM の各濃度に調整し、アジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl) を加え、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 6 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性

組換え AtPYL2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 2.5 µM, 40 µl) に、最終濃度がそれぞれ 0.4 nM, 4 nM, 40 nM, 400 nM となるようにアジドプローブ **33** (MeOH, 2 µl) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 6 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 4 項　アジドプローブ **33** の有効性の確認

・あらかじめアジドプローブ **33** とリンカー**26** を結合させる場合

アジドプローブ **33** (MeOH, 0.33 mM)、リンカー**26** (MeOH, 0.33 mM) および CuI (H_2O, 6.7 µM) を MeOH 中で 1 時間インキュベートした。本溶液 (6 µl) を組換え AtPYL2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 40 µl) に添加し、さらに 1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 6 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

・過剰量の ABA を添加する場合

組換え AtPYL2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 40 µl) にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl) および ABA (**29**) (MeOH,

最終濃度 400 µM, 2 µl）を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 6 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 5 項　大腸菌粗酵素液中の AtPYL2 の検出

組換え AtPYL2 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.0 mg/ml）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl）を添加した。その他の操作は、第 6 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 6 項　リンカー**1** を用いる手法（光反応基を用いる手法）

組換え AtPYL2 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, 最終濃度 10 µM, 40 µl）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl）を加え、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**1** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl)と CuI (最終濃度 0.5 µM) を加え、さらに 1 時間インキュベートした。360 nm の紫外線を 1 時間照射し、架橋反応を行わせた。本反応液 30 µl をウェスタンブロッティング解析に供し、検出を行った。

第 7 節　AtTRXh3 のアフィニティーラベル化

特に断らない限り、実験操作はすべて氷上で行った。

第 1 項　リンカー**26** を用いる手法（タンパク質架橋剤 BS3 を用いる手法）

組換え AtTRXh3 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 最終濃度 2.5 µM もしくは 5.0 µM, 42 µl）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl）を加え、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**26** (MeOH, 最終濃度 40 µM, 2 µl）と CuI (H_2O, 最終濃度 0.80 µM, 2 µl）を加え、さらに 1 時間インキュベートした。タンパク質架橋剤 BS3 (**25**) (H_2O, 最終濃度 40 µM, 2 µl）を加え、1 時間インキュベートし、架橋反応を行わせた。本反応液 30 µl をウェスタンブロッティング解析に供し、検出を行った。

第 2 項　過剰量の ABA を添加した場合

組換え AtTRXh3 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 最終濃度 2.5 μM もしくは 5.0 μM, 42 μl) にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 2 μl) および ABA (**29**) (MeOH, 最終濃度 4 mM) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 7 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 3 項　化学発光シグナルに対するアジドプローブ **33** の濃度依存性

組換え AtTRXh3 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 最終濃度 5.0 μM, 42 μl) に、最終濃度がそれぞれ 0.0004 nM, 0.04 nM, 4 nM, 400 nM となるようにアジドプローブ **33** (MeOH, 2 μl) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 7 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 8 節　タンパク質架橋剤 DTSSP を利用した標的タンパク質の精製

特に断らない限り、実験操作はすべて氷上で行った。

第 1 項　大腸菌粗酵素液中からの AtPYL2 の精製

IPTG 誘導（25℃, 2 h）により組換え AtPYL2 の生産を誘導した大腸菌のタンパク質粗抽出液（100 μg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 50 μl) を添加し、1 時間インキュベートした。その後、リンカー**26** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 50 μl)と CuI (H_2O, 最終濃度 0.80 μM, 50 μl) を加え、さらに 1 時間インキュベートした。タンパク質架橋剤 DTSSP (**34**) (H_2O, 最終濃度 40 μM, 50 μl) を加え、1 時間インキュベートし、架橋反応を行わせた。反応後のタンパク質粗抽出液を Streptavidin HP SpinTrap（GE Healthcare）に供した。2 M 尿素溶液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 400 μl）で担体の洗浄を 5 回繰り返した。その後、100 mM DTT 溶液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 400 μl）で標的タンパク質の溶出を 2 回行った。

第 2 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の濃度依存性

組換え AtPYL2 を生産した大腸菌のタンパク質粗抽出液（100 μg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）に、最終濃度がそれぞれ 0.04 nM, 4 nM, 400 nM となるようにアジドプローブ **33** (MeOH, 50 μl) を添加した。その他の操作は、第 8 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 3 項　AtPYL2 精製における DTSSP の濃度依存性

組換え AtPYL2 を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液（100 μg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）に、最終濃度がそれぞれ 0.04 nM, 4 nM, 400 nM となるように DTSSP (**34**) (H_2O, 50 μl) を添加した。その他の操作は、第 8 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 4 項　AtPYL2 精製におけるタンパク質粗抽出液の濃度依存性

反応に用いるタンパク質粗抽出液の濃度をそれぞれ 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml となるように調整した。その他の操作は、第 8 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 5 項　AtPYL2 精製におけるアジドプローブ **33** の有効性の検証

・あらかじめアジドプローブ **33** とリンカー**26** を結合させる場合

アジドプローブ **33** (MeOH, 333 μM)、リンカー**26** (MeOH, 333 μM) および CuI (H_2O, 0.27 μM) を 1 時間インキュベートした。本溶液（150 μl）を組換え AtPYL2 を生産した大腸菌のタンパク質粗抽出液（100 μg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）に添加し、さらに 1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 8 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

・過剰量の ABA を添加した場合

組換え AtPYL2 を生産した大腸菌のタンパク質粗抽出液（100 μg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 50 μl) および ABA (**29**) (最終濃度 4 mM) を添加し、1 時間インキュベートした。その他の操作は、第 8 節第 1 項に記載した方法に従って行った。

第 6 項　シロイヌナズナ由来のタンパク質粗抽出液からのアブシジン酸結合タンパク質の精製

シロイヌナズナの PP2C 遺伝子（AT4G26080）欠損株（SALK_038866C）を人工気象器（明期：8 時間、暗期：16 時間、22℃）で 5 週間育成した。植物体の葉部（0.8 g）を液体窒素で凍結破砕し、10 ml の 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8, 100 mM NaCl) に浸漬し、4℃で一晩抽出した。遠心分離（5000 rpm, 15 min, 4℃）を行い、不溶性成分を除去することでタンパク質粗抽出液を得た。本タンパク質粗抽出液（1.0 mg/ml, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 ml）にアジドプローブ **33** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 50 μl) を添加し、1 時間インキュベートした。その後、リンカー **26** (MeOH, 最終濃度 40 μM, 50 μl) と CuI (H_2O, 最終濃度 0.80 μM, 50 μl) を加え、さらに 1 時間インキュベートした。タンパク質架橋剤 DTSSP (**34**) (H_2O, 最終濃度 40 μM, 50 μl) を加え、1 時間インキュベートし、架橋反応を行わせた。反応後のタンパク質粗抽出液を Streptavidin HP SpinTrap（GE Healthcare）に供した。2 M 尿素溶液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 400 μl）で担体の洗浄を 3 回繰り返した。その後、100 mM DTT 溶液（50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 100 mM NaCl, 400 μl）で標的タンパク質の溶出を 2 回行った。

第 9 節　ウェスタンブロッティング

第 1 項　使用した機器

実験に用いた機器を以下に示す。

電気泳動槽：Bio-rad Laboratories ミニプロティアン SD セル

ブロッティング装置：Bio-rad Laboratories トランスブロット SD セル

化学発光検出装置：AISIN LumiVisionPro 400EX

第 2 項　SDS-PAGE 電気泳動

アフィニティーラベル化を行ったタンパク質溶液に 4×sample buffer を 1 倍となるように加えて 3 分間煮沸し、泳動用試料とした。泳動緩衝液として、10× running buffer (250 mM Tris base, 1.92 M glycine, 1% SDS) を 10 倍希釈して用いた。濃縮ゲルおよび分離ゲルは、ポリアクリルアミド濃度がそれぞれ 4%および 10%のものを使用した。タンパク質の分子量マーカーとしてプレステインマーカー (Bio-Rad Laboratories) を用いた。なお、電気泳動槽にはミニプロティアン 3 (Bio-Rad Laboratories) を使用し、定電圧 200V の条件で BPB の青色がゲルの下端に達するまで電気泳動を行った。

第 3 項　ブロッティング

電気泳動後のタンパク質分子を、ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへエレクトロブロッティング法により転写した。電気泳動後の分離ゲルは不要な部分を除去した後、ブロッティングバッファー (25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glycine, 10% MeOH) に浸した。クリアトランス® SP PVDF メンブレン（富士フィルム和光純薬）は分離ゲルと同じ大きさに切った後、MeOH に 20 秒間、超純水に 1 分間、ブロッティングバッファーに 5 分間浸し、親水化処理を行った。2 枚のブロットアブソーベントフィルターペーパー（BIORAD）を分離ゲルと同じ大きさに切った後、ブロッティングバッファーに浸した。メンブレンに分離ゲルを載せ、ブロットアブソーベントフィルターペーパーで挟み、ゲル側を陰極に、メンブレン側を陽極にセッティングして、定圧 20V の条件で 1 時間転写した。なお、ブロッティング装置にはセミドライ式のトランスブロット SD セル (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

第 4 項　ブロッキング

転写後のメンブレンには、標的タンパク質以外のタンパク質も結合している。反応させる

抗体が非特異的にタンパク質に結合するのを防ぐため、非特異的な結合部位をあらかじめ飽和しておく必要がある。そのために、転写後のメンブレンをブロッキング剤（5% スキムミルク in PBS-T buffer）に浸し、4℃で一晩ブロッキングを行った。その後、新しい PBS-T buffer (80 mM Na_2HPO_4, 20 mM NaH_2PO_4, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20）に浸し、2 分間振盪して洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。

第 5 項　膜上での反応

アフィニティーラベル化によりビオチン化された標的タンパク質の検出には、HRP-Conjugated Streptavidin (ThermoFisher）を PBS-T buffer で試薬濃度を 1/5000 に希釈し検出溶液（50 ml）とした。また、Histag を有する組換え AtPYL2 の検出には、Anti-His-tag mAb-HRP-DirecT (MBL ライフサイエンス）を 1/10000 に希釈し検出溶液（50 ml）とした。本検出溶液にブロッキング後のメンブレンを浸して、室温で 1 時間振盪した。その後、新しい PBS-T buffer に浸し振盪して、メンブレンを洗浄した（2 分間を 2 回, 15 分間を 1 回, 5 分間を 3 回）。

第 6 項　検出

高感度で安全性も高く、操作が簡便でかつ市販の標識ストレプトアビジンが使用できるため、化学発光での検出を行った。検出試薬には Immunostar Zeta (富士フィルム和光純薬）を用いた。ECL 反応[58]ではフェノール環を持つ化合物などのエンハンサーの存在下で、HRP によってルミノールが酸化されて化学発光が起こる（図 42)。

抗体反応後のメンブレンのブロット面を Immunostar Zeta (富士フィルム和光純薬）で浸し 5 分間室温で静置した。メンブレンをピンセットでつまみあげ、メンブレンの端を紙に付けて余分な検出試薬を取り除いた。メンブレンをラップで包み、化学発光検出装置 LumiVisionPro 400EX (AISIN）で検出した。

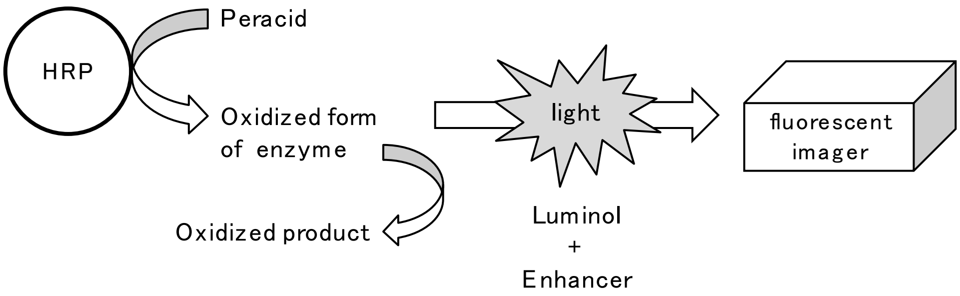


図 42. ECL 反応によるウェスタンブロッティングの原理.

第 10 節　プロテオーム解析

第 1 項　AtPYL2 の同定におけるペプチド溶液の調製

タンパク質溶液に最終濃度 25%となるようにトリクロロ酢酸を加え、タンパク質を沈殿させた。得られた沈殿をアセトンで 2 回洗浄した後、10 µg のタンパク質沈殿を 10 µl の尿素水溶液（8 M）に溶解させた。70 µl の還元アルキル化溶液（50 mM DTT, 25 mM 炭酸水素アンモニウム）を加え、50℃で 30 分振盪した。その後、最終濃度 500 mM となるようにヨードアセトアミドを反応液に添加し、暗所かつ室温で 30 分振盪した。Proteomic grade Trypsin (Roche Diagnostics) を加え、37℃で 12 時間反応させた。その後、ZipTip-C18 column (Millipore) を用いて脱塩し、ペプチド溶液を得た。

第 2 項　シロイヌナズナの ABA 結合タンパク質の同定におけるペプチド溶液の調製

電気泳動後にシルベストステイン ワン（ナカライテスク）を用いて銀染色を行い、目的のタンパク質バンドを切り出し、マイクロチューブに移した。シルベストデステインキットを用いて記載されている方法に従い、ゲルの脱色を行った。500 µl の還元アルキル化溶液 1（10 mM DTT, 100 mM 炭酸水素アンモニウム, 0.3% EDTA, pH 8.5）を加え、15 分振盪した。還元アルキル化バッファー1 を除去した後、500 µl の還元アルキル化溶液 2（100 mM アクリルアミド, 100 mM 炭酸水素アンモニウム, 0.3% EDTA, pH 8.5）を加え、15 分振盪した。還元アルキル化バッファー2 を除去した後、100 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を加え、10 分振盪した。その後、XL-Tryp Kit (アプロサイエンス) を用いて、ゲル内トリ

プシン消化を行った。トリプシン消化後のサンプルに 0.1% TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液を 150 µl 加え、30 分振盪した後、上清を新しいマイクロチューブに移した。この操作を 2 回繰り返した。得られた溶液を遠心濃縮機により 10 µl 程度に濃縮した。その後、C18-ZipTip (Millipore) を用いて脱塩し、ペプチド溶液を得た。

第 3 項　ペプチド断片の検出

第 10 節第 1 項および第 10 節第 2 項で調製したペプチドサンプルは nano LC-MS/MS を用いて解析した。ナノフロー液体クロマトグラフィーシステムとして Easy nLC1000 liquid chromatography system (ThermoFisher)、質量分析計として Q-exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher) を用いた。カラムには C18 capillary tip column (NTCC-360/75-3-125, Nikkyo Techno) を用いた。移動相としてアセトニトリルと水の混合溶液を使用し、120 分間でその組成（アセトニトリル/水）を 5/95 から 30/70 に変化させ、グラジエント溶離を行った。得られた MS/MS スペクトルは、Proteome Discoverer 2.1 (ThermoFisher) を用いて分析し、タンパク質の同定を行った。

略語一覧

ABA	Abscisic acid
Ac	Acetyl group
AcOH	Acetic acid
AOC	Allene oxide cyclase
AOS	Allene oxide synthase
Boc	*tert*-Butoxycarbonyl
br.	Broad
BSA	Bovine serum albumin
BS3	Bis[sulfosuccinimidyl]suberate
calcd.	Calculated
CBB	Coomassie brilliant blue
conc.	Concentrated
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMF	*N,N*-dimethylformamide
DMAP	*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTSSP	Dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
12,13-EOT	(12,13*S*)-epoxy-(9*Z*,11*E*,15*Z*)-octadecatrienoic acid
Et	Ethyl group
Et_2O	Diethyl ether
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
EI-MS	Electron ionization mass spectrometry
FI-MS	Field ionization-mass spectrometry
FD-MS	Field desorption-mass spectrometry
FD-HR-MS	Field desorption- High resolution mass spectrometry

HOBt	1-hydroxybenzotriazole
13-HPOT	13(*S*)-hydroperoxy-(9*E*, 11*Z*, 15*Z*)-octadecatrienoic acid
HRP	Horseradish Peroxidase
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
JA	Jasmonic acid
JA-Ile	Jasmonyl-L-isoleucine
KOAc	Potassium acetate
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
Me	Methyl group
MeOH	Methanol
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS-T	Phosphate buffered saline with Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction
Pd-C	Palladium on carbon
Ph	Phenyl group
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PPTS	Pyridinium *p*-toluenesulfonate
PP2C	Protein phosphatase 2C
PTLC	Preparative thin-layer chromatography
PYR	Pyrabactin resistance
PYL	Pyrabactin resistance 1-like
RCAR	Regulatory components of ABA receptor
r.t.	Room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SnRK	SNF1-related protein kinase
SPR	Surface plasmon resonance

Sol.	Solution
TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
TEA	Triethylamine
TFA	Trifluoroacetic acid
TfOH	Trifluoromethanesulfonic acid
TGS	Target-guided synthesis
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TLC	Thin-layer chromatography
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TRX	Thioredoxin
Ts	Tosyl group
UV	Ultraviolet

参考文献

1. Budin G.; Dimala M. M.; Lamour V.; Oudet P.; Mioskowski C.; Meunier S.; Brino L.; Wagner A. A chemical labeling strategy for proteomics under nondenaturing condition. *ChemBioChem.* 11, 79-82 (2010)
2. Harding M. W.; Galat A.; Uehling D. E.; Schreiber S. L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* 341, 758-760 (1989)
3. Fabry M.; Brandenburg D. Design and synthesis of a novel biotinylated photreactive insulin for receptor analysis. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 373, 143-150 (1992)
4. Stewart S. G.; Braun C.J.; Polomska M. E.; Karimi M.; Abraham L. J.; Stubbs K. A. Efforts toward elucidating thalidomide's molecular target: an expedient synthesis of the first thalidomide biotin analogue. *Org Biomol Chem.* 8, 4059-4062 (2010)
5. Marie J.; Seyer R.; Lombard C.; Desarnaud F.; Aumelas A.; Jard S.; Bonnafous J. C. Affinity chromatography purification of angiotensin II receptor using photoactivable biotinylated probes. *Biochemistry.* 29, 8943-8950 (1990)
6. Huisen R. 1, 3-Dipolar cycloaddition chemistry. *Proc Chem Soc.* Octobor, 357-396 (1961)
7. Friso G.; Olinares P. D.; van Wijk K. J. The workflow for quantitative proteome analysis of chloroplast development and differentiation, chloroplast mutants, and protein interactions by spectral counting. *Methods Mol Biol.* 775, 265–282 (2011)
8. Baumert H.G.; Fasold H. Cross-linking techniques. *Methods Enzymol.* 172, 584-609 (1989)
9. Speers A. E.; Cravatt B. F. Chemical strategies for activity-based proteomics. *ChemBioChem.* 5, 41-47 (2004)

10. Wofsy L.; Metzger H.; Singer S. J. Affinity labeling-a general method for labeling the active sites of antibody and enzyme molecules. *Biochemistry.* 1, 1031-1039 (1962)
11. Kanoh N.; Kumashiro S.; Simizu S.; Kondoh Y.; Hatakeyama S.; Tashiro H.; Osada H. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42, 5584-5587 (2003)
12. Kanoh N.; Asami A.; Kawatani M.; Honda K.; Kumashiro S.; Takayama H.; Simizu S.; Amemiya T.; Kondoh Y.; Hatakeyama S.; Tsuganezawa K.; Utata R.; Tanaka A.; Yokoyama S.; Tashiro H.; Osada H. Photo-cross-linked small-molecule microarrays as chemical genomic tools for dissecting protein-ligand interactions. *Chem Asian J.* 1, 789-797 (2006)
13. Kanoh N.; Kyo M.; Inamori K.; Ando A.; Asami A.; Nakao A.; Osada H. SPR imaging of photo-cross-linked small-molecule arrays on gold. *Anal Chem.* 78, 2226-2230 (2006)
14. Kanoh N.; Honda K.; Simizu S.; Muroi M.; Osada H. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl.* 4, 3559-3562 (2005)
15. Kanoh N.; Takayama H.; Honda K.; Moriya T.; Teruya T.; Simizu S.; Osada H.; Iwabuchi Y. Cleavable linker for photo-cross-linked small-molecule affinity matrix. *Bioconjug Chem.* 21, 182-186 (2010)
16. Hatanaka Y.; Sadakane Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Curr Top Med Chem.* 2, 271-288 (2002)
17. Hashimoto M.; Hatanaka Y. Recent progress in diazirine-based photoaffinity labeling. *Eur J Org Chem.* 15, 2513-2523 (2008)

18. Tomohiro T.; Hashimoto M.; Hatanaka Y. Cross-linking chemistry and biology: development of multifunctional photoaffinity probes. *Chem Record.* 5, 385-395 (2005)

19. Hatanaka Y.; Hashimoto M.; Kanaoka Y. A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine. *Bioorg Medchem.* 2, 1367-1373 (1994)

20. Kolb H. C.; Finn M. G.; Sharpless K. B.; Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed.* 40, 2004-2021 (2001)

21. Tornøe C. W.; Christensen C.; Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem.* 67, 3057-3062 (2002)

22. Rostovtsev V. V.; Green L. G.; Fokin V. V.; Sharpless K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41, 2596-2599 (2002)

23. Presolski S. I.; Hong V. P.; Finn M. G. Copper-catalyzed azide–alkyne click chemistry for bioconjugation. *Curr Protoc Chem Biol.* 3, 153–162 (2011)

24. Link A. J.; Tirrell D. A. Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J Am Chem Soc.* 125, 11164-11165 (2003)

25. Baskin J. M.; Prescher J. A.; Laughlin S. T.; Agard N. J.; Chang P. V.; Miller I. A.; Lo A.; Codelli J. A.; Bertozzi C. R. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 16793-16797 (2007)

26. Rideout D. Self-assembling cytotoxins. *Science.* 233, 561-563 (1986)

27. Rideout D.; Calogeropoulou T.; Jaworski J.; McCarthy M. Synergism through direct covalent bonding between agents: a strategy for rational design of chemotherapeutic combinations. *Biopolymers.* 29, 247-262 (1990)

28. Krasiński A.; Radić Z.; Manetsch R.; Raushel J.; Taylor P.; Sharpless K. B.; Kolb H. C. *In situ* selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J Am Chem Soc.* 127, 6686-6692 (2005)

29. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signaling transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100, 681-697 (2007)

30. Blee E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315-322 (2002)

31. Schaller F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J Exp Bot.* 354, 11-23 (2001)

32. Laudert D.; Pfannschmidt U.; Lottspeich F.; Holländer-Czytko H.; Weiler E. W. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol.* 31, 323-335 (1996)

33. Froehlich J. E.; Itoh A.; Howe G. A. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelop. *Plant Physiol.* 125, 306-317 (2001)

34. Bandara P. K.; Takahashi K.; Sato M.; Matsuura H.; Nabeta K. Cloning and functional analysis of allene oxide synthase in *Physcomitrella patens*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73, 2356-2359 (2009)

35. 大村恒雄、石村巽、藤井義明　「P450 の分子生物学」　講談社 (2003)

36. Lee D. S.; Nioche P.; Hamberg M.; Raman C. S. Structual insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature.* 455, 363-368 (2008)

37. Testa B.; Jenner P. Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action. *Drug Metab Rev.* 12, 1-117 (1981)

38. Murray M. Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P450 enzymes. *Mol Med.* 3, 227-265 (1999)

39. Rogerson T. D.; Wilkinson C. F. Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol.* 26, 1039-1042 (1977)

40. Oh K.; Murofushi N. Design and synthesis of novel imidazole derivatives as potent inhibitors of allene oxide synthase (CYP74). *Bioorg Med Chem.* 10, 3701-3711 (2002)

41. Pan Z.; Camara B.; Gardner H. W.; Backhaus R. A. Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrom P450, allene oxide synthases, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. *J Biol Chem.* 273, 18139-18145 (1998)

42. Baldwin S. J.; Bloomer J. C.; Smith G. J.; Ayrton A. D.; Clarke S. E.; Chenery R. J. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica.* 25, 261-270 (1995)

43. Oh K.; Asami T.; Matsui K.; Howe G. A.; Murofushi N. Characterization of novel imidazole derivative, JM-8686, a potent inhibitor of allene oxide synthase. *FEBS Lett.* 580, 5791-5796 (2006)

44. Oh K.; Shimura Y.; Ishikawa K.; Ito Y.; Asami T.; Murofushi N.; Yoshizawa Y. Asymmetric synthesis and stereochemical structure-activity relationship of (*R*)- and (*S*)-8-[1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazol-1-yl-ethoxy] octanoic acid heptyl ester, a potent inhibitor of allene oxide synthase. *Bioorg Med Chem.* 16, 1090-1095 (2008)

45. Yamaguchi-Shinozaki K.; Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 57, 781-803 (2006)

46. Zhu J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53, 247-273 (2002)
47. Finkelstein R.; Reeves W.; Ariizumi T.; Steber C. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 387-415 (2008)
48. Lin B. L.; Wang H. J.; Wang J. S.; Zaharia L. I.; Abrams S. R. Abscisic acid regulation of heterophylly in Marsilea quadrifolia L.: effects of *R*-(-) and *S*-(+) isomers. *J Exp Bot.* 56, 2935-2948 (2005)
49. Todoroki Y.; Tanaka T.; Kisamori M.; Hirai N. 3'-Azidoabscisic acid as a photoaffinity reagent for abscisic acid binding proteins. *Bioorg Med Chem lett.* 11, 2381-2384 (2001)
50. Umezawa T.; Sugiyama N.; Mizoguchi M.; Hayashi S.; Myouga F.; Yamaguchi-Shinozaki K.; Ishihama Y.; Hirayama T.; Shinozaki K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 17588-17593 (2009)
51. Park S. Y.; Fung P.; Nishimura N.; Jensen D. R.; Fujii H.; Zhao Y.; Lumba S.; Santiago J.; Rodrigues A.; Chow T. F. F.; Alfred S. E.; Bonetta D.; Finkelstein R.; Provart N. J.; Desveaux D.; Rodriguez P. L.; McCourt P.; Zhu J. K.; Schroeder J. I.; Volkman B. F.; Cutler S. R. Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science.* 324, 1068-1071 (2009)
52. Gelhaye E.; Rouhier N.; Navrot N.; Jacquot J. P. The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci.* 62, 24-35 (2005)
53. Jung Y. J.; Chi Y. H.; Chae H. B.; Shin M. R.; Lee E. S.; Cha J. Y.; Paeng S. K.; Lee Y.; Park J. H.; Kim W. Y.; Kang C. H.; Lee K. O.; Lee K. W.; Yun D. J.; Lee S. Y. Analysis of Arabidopsis thioredoxin-h isotypes identifies discrete domains that confer specific structural and functional properties. *Biochem J.* 456, 13-24 (2013)

54. Park S. K.; Jung Y. J.; Lee J. R.; Lee Y. M.; Jang H. H.; Lee S. S.; Park J. H.; Kim S. Y.; Moon J. C.; Lee S. Y.; Chae H. B.; Shin M. R.; Jung J. H.; Kim M. G.; Kim W. Y.; Yun D. J.; Lee K. O.; Lee S. Y. Heat-shock and redox-dependent functional switching of an h-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiol.* 150, 552–561 (2009)

55. Li Y. C.; Ren J. P.; Cho M. J.; Zhou S. M.; Kim Y. B.; Guo H. X.; Wong J. H.; Niu H. B.; Kim H. K.; Morigasaki S.; Lemaux P. G.; Frick O. L.; Yin J.; Buchanan B. B. The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds. *Mol Plant.* 2, 430-441 (2009)

56. Takeuchi J.; Okamoto M.; Akiyama T.; Muto T.; Yajima S.; Sue M.; Seo M.; Kanno Y.; Kamo T.; Endo A.; Nambara E.; Hirai N.; Ohnishi T.; Cutler S. R.; Todoroki Y. Designed abscisic acid analogs as antagonists of PYL-PP2C receptor interactions. *Nat Chem Biol.* 10, 477-482 (2014)

57. 長田　憲幸、Theobroxide 処理に伴う植物の病原菌に対する抵抗力への影響、修士論文（2019）

58. Whitehead T. P.; Kricka L. J.; Carter T. J.; Thorpe G. H. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 25, 1531-1546 (1979)

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました本学農学研究院生物有機化学研究室の松浦英幸教授に心から感謝します。7年間に渡り、常に温かく指導していただいたおかげで研究を楽しく進めることができ、研究者としての進路を志すようになりました。感謝を述べるとともに、今後ともご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

そして、本研究におけるすべてにおいてご指導いただいた東京農業大学応用生物科学部の高橋公咲教授に深く感謝いたします。東京農業大学に異動されてからも実験から論文執筆に至るまで親身にご指導いただきました。大変感謝しております。

本論文の主査を担当して頂きました本学農学研究院生物情報分子解析学研究室の福士幸治准教授に心より感謝いたします。

本論文の副査を担当して頂きました本学農学研究院生物化学研究室の森春英教授に深く感謝いたします。

研究においてご助言頂き、本論文の副査を担当して頂きました本学農学研究院生態化学生物学研究室の橋本誠准教授に心より感謝いたします。

マススペクトルを測定してくださいました本学農学部 GC-MS・NMR 測定室　福士江里博士ならびに高田祐輔氏に心より感謝いたします。

ペプチドのアミノ酸配列解析をして頂き、研究についてのご助言を賜りました本学農学研究院ゲノム生化学研究室の高須賀太一准教授ならびに大橋慧介氏に深く感謝いたします。

多くの器具および機器を貸していただいた生態化学生物学研究室ならびに食品栄養学研究室の皆様に感謝いたします。

組換え AtPYL2 作製におけるプラスミドをご提供いただきました宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの岡本昌憲准教授に深く感謝いたします。

著者は日本学術振興会特別研究員であり、本研究は日本学術振興会の援助により遂行されたものです。深く感謝いたします。

最後に、充実した研究生活を送ることができたのは、研究のみにとどまらず、様々な点においてご支援、ご協力いただきました生物有機化学研究室の先輩、同輩ならびに後輩の方々のおかげです。心から感謝の意を表します。

2020 年 1 月