

Recent advances in protein chemical modification.

Tamaki Jikyo

Department of Molecular Biosciences, Institute of Preventive and Medicinal Dietetics, Nakamura Gakuen University

(Received April 1, 2010)

Abstract

Chemical modification of protein is an arduous but fruitful task. Many chemical methods have been developed for structure determination, protein engineering and proteomics technology by carefully balancing reactivity and selectivity. We have in hand an arsenal of tools from which we can select a relevant reaction to tackle their problems. Identification and quantification of multiple proteins from complex mixtures is a central theme in post-genomic biology. Chemical modification reactions are available in various protocols for mass-spectrometry-based proteome analysis. In this review, I will present the most popular and effective methods employing chemical modifications of proteins.

タンパク質の化学修飾法 最近の進歩

治京 玉記

中村学園大学薬膳科学研究所分子栄養学部門

キーワード

化学修飾法、プロテオーム解析、安定同位体標識法

(2010年4月1日受理)

緒 言

タンパク質は、生命体の主要な機能性分子であり、その性質は、治療薬、触媒あるいは材料として用いられるほど大変有用である。多くの病気がタンパク質の機能を消失させる突然変異に由来している。例えば、フェニルケトン症では、触媒活性が損なわれ、そのため代謝経路が変わり、筋ジストロフィーのように構造特性が損なわれ、物理的機能の喪失がもたらされる例もある。クロイツフェルト・ヤコブ病やその他の伝染性脳症は、タンパク質がその形を変え、重合体を形成した結果もたらされている¹。同様に、アミロイド症に起因する病気では、タンパク質は徐々にシート重合体の長い鎖に変わり、沈殿して繊維を形成する²。多くの癌がタンパク質の突然変異に由来しており、ヒトの癌の約50%は腫瘍抑制タンパク質 p53の突然変異によって引き起こされているが、

これらの突然変異は主にこのタンパク質の安定性を低下させている³。酵素と受容体はよく薬物の標的となるが、このような薬物によって機能が回復したり、感染性病原体や癌が破壊されたりする。タンパク質科学の究極の目的は、タンパク質の構造と活性、そして、それがどのようにリガンドと結合するかを初めから予測できるようになることである。これが成し遂げられたとき、新規な触媒や材料、そして、病気を除去して不健康状態を最小限にとどめる薬剤を設計し合成することが可能になる。

現在のタンパク質研究では、直接の観測結果が試薬の構造上の変化と結び付けられてきており、酵素と安定反応中間体の構造をX線結晶解析によって直接観測したり、過度的中間体を速度論的分光法によって特徴づけたり、遷移状態の構造を直接の速度論的測定から推論されている。さらに、基質の構造を化学合成あるいは化学修飾を用いて変えたり、酵素の構造をタンパク質工学を用いて変えたりすることによって、構造と活性の相互作用を直

接研究することが可能となっている。

本稿では、タンパク質の機能と構造、タンパク質中のアミノ酸残基の化学修飾法についての一般的所見から最先端技術として化学修飾法を利用したプロテオーム解析について概説する。

タンパク質の機能と構造^{4,6}

タンパク質は、最も多目的に用いられている細胞の構成高分子であり、タンパク質の機能とは、タンパク質分子が単独で示す生化学的機能であり、また他のタンパク質分子との会合体もしくは複合体の一部として果たす細胞機能や、細胞もしくは生物内で生じる表現型を意味することもある。タンパク質の生化学的機能の主な例は、

結合形成、触媒作用、分子スイッチ機能、細胞や生物の構造体としての機能がある。

結合形成：結合相手となる分子を特異的に認識することは、タンパク質機能の中心であり、タンパク質に結合する分子（リガンド）は、ミオグロビンのヘム基に配位する酸素分子のような低分子のこともあるが、TATA 結合タンパク質が結合することによって歪められる特定の DNA 配列（TATA ボックス）のような高分子のこともある。特異的な結合形成は、形状の相補性および水素結合などの極性作用により決定される。

触媒作用：生体細胞における化学反応は基本的には例外なく触媒作用により起こり、触媒の大半はタンパク質からなる酵素である。酵素の触媒効率は際立っており、反応系は単純な緩衝作用による触媒反応の 10^{17} 倍にも加速される。多くの構造的特性が酵素の触媒能に影響を与え、反応基が化学反応に都合のよい向きにまとまって存在する（近接性）、化学反応が基底状態にある複合体に比べて遷移状態の場合に、より強固に結合する（遷移状態安定化）、酸塩基触媒反応などが見られる。

分子スイッチ機能：タンパク質は柔軟性のある分子であり、その立体構造は pH 変化やリガンドの結合に応じて変化しうる。このような構造変化は、細胞内プロセスを制御する分子スイッチとして作用する。例えば、多くの癌でのきわめて重要な分子スイッチは低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras の GTP が GDP に加水分解された際に生じる構造変化である。GTP 結合型 Ras は ON（活性化）状態で、細胞を増殖させるシグナルを伝達する。GDP 結合型は OFF（不活性化）状態でシグナルを伝達しない。

構造タンパク質：タンパク質は生体システムの主要な構成要素の一部として機能し、この機能は、タンパク質のサブユニット同士、および他種タンパク質、糖質などの特異的な会合の影響を受けている。このことが、ア

クチン繊維のような複雑なシステムの自発的アセンブリ（組み立て）を可能にしている。構造タンパク質はまた、絹、コラーゲン、ケラチンといったバイオマテリアル（医用生体材料）の重要な供給源でもある。

タンパク質は、DNA ポリメラーゼや遺伝子調整タンパク質が DNA に結合する場合のように、タンパク質以外の生体高分子に結合することもあるが、輸送体や、シグナル伝達分子を結合する受容体の場合には、タンパク質に結合する。この結合機能はタンパク質表面の示す構造的かつ化学的な多様性によるもので、そのためタンパク質はその他のタンパク質分子と高度に特異的に相互作用することが可能となる。タンパク質の触媒作用には、基質や場合によっては調整タンパク質分子に対する特異的な結合だけでなく、特異的な化学反応性もまた必要である。調整を受ける酵素や分子スイッチ、例えばシグナル伝達のための G タンパク質（GTP の加水分解を触媒する酵素）では、構造の安定性と柔軟性との微妙なバランスの影響を受ける大規模なコンフォメーション変化が必要である。構造タンパク質には、絹のように優れた強度や、毛髪、角、羽毛の構造タンパク質であるケラチンのように強靭さと耐久性を示すものがある。もしくはアクチンやチューブリンのように、ヌクレオチドの加水分解による複雑な動力学的特性をもつこともある。タンパク質が示す、この並外れた機能上の多様性と多目的性は、構成アミノ酸側鎖の化学的多様性、ポリペプチド鎖の柔軟性、さらに、様々なアミノ酸配列のポリペプチドがとるきわめて多彩な折りたたまれ方から生じている。

タンパク質の主要成分は枝分かれのないポリペプチド鎖であり、1つの残基の α -カルボキシル基が次の残基の β -アミノ基とアミド結合によってつながられた L- α -アミノ酸より構成されている。ポリペプチド鎖の生合成後に共有結合的修飾を受けることはあるが、通常、20種類のアミノ酸だけで構成されている（図1）。

タンパク質は、図2に示すとおりペプチド結合でつながったアミノ酸の鎖である。それぞれの C 原子の周りで鎖が回転するため、鎖は多数のコンフォメーションをとりうる。タンパク質の三次元構造の違いをもたらすのは、これらのコンフォメーションの変化である。鎖中の各アミノ酸は極性を帯びている。つまり、正と負に電荷した領域が分離しており、それらは、水素結合の受容基として働きうる化学的に自由な C=O 基と水素結合の供与基として働きうる NH 基である。これらの基が、タンパク質構造の中で相互作用する。タンパク質中に見つかる20種類のアミノ酸は、それらの R 基（側鎖）の化学的性質に従って分類される。R 側鎖は構造的に重要な役割を果たしており、グリシンとシステインは特別な役割を果たしている。グリシンは側鎖をもたず、し

たがって、構造上の柔軟性を局所的に高めうる。システインは、もう1つのシステインと反応して、タンパク質構造を安定化する架橋を形成する。

タンパク質のコアの大部分は、三次元の配置へと折りたたまれたヘリックスとシートという基本的な二次構造からなる。二次構造中では、隣接するアミノ酸の間に水素結合の規則的なパターンが形成される。そして、それらのアミノ酸は一定の角度を持っており、これらの構造が形成されることにより、各アミノ酸の極性は中和される。こうした二次構造は、タンパク質コア中にきつく詰め合されて疎水性の環境に置かれている。各アミノ酸の側鎖が占める事でできる体積は限られており、また、他の近くの側鎖との可能な相互作用の数も限られている。

ポリペプチドがタンパク質として機能するには、通常、生理的条件下で安定な三次元構造（フォールド）を形づくることが可能でなければならない。その反面、タンパク質が機能するには、折りたたまれたタンパク質が適度に柔軟であることが求められている。おそらくこの制約のために、タンパク質がとることのできる折りたたみ構

造の種類は、多いとはいえ限られていると考えられる。フォールドの種類がさほど多くないことが、安定なフォールド数に対する物理的な制約を示しているのか、単に、既存の安定なフォールドからの分岐進化上の都合のためであるかは明らかにされていない。しかしこれは実用面での重要な問題であり、自然状態ではありえない安定なフォールドが多数あるとすれば、産業上の利用や医療用の目的で全く新規のタンパク質を作製することが可能になることになる。

アミノ酸側鎖（図1）は、側鎖間や水分子との相互作用に際して多様な性質をもつ。アミノ酸側鎖の違いは、タンパク質の安定性や機能に大きく影響を及ぼす。

疎水性アミノ酸残基間にはファンデルワールス相互作用のみが働き、水分子との接触を避けて互いに密着しようとする疎水性残基の性質により、疎水性相互作用が生じる。アラニンやロイシンはヘリックス構造を非常に形成しやすい残基であるが、プロリンがヘリックスに含まれることはまれである。これは、プロリンではペプチド骨格を形成する窒素原子において、ヘリックス構造に必要な水素結合が形成されないためである。フェニルアラニンの芳香族側鎖は、場合によっては、弱い極性相互作用に寄与する。

親水性アミノ酸残基は、相互に、またペプチド骨格、極性有機分子、水分子と水素結合を形成することができる。この親水性という性質がその関与する相互作用を決定づけている。親水性残基のいくつかは、pHや微小環境に応じて電荷状態を変化させ、アスパラギン酸やグルタミン酸は、水溶液中でのpKa値が5に近いため、通常はプロトン化されることなく、pH7では負に荷電している。ところが、タンパク質分子の疎水性内部環境では両アミノ酸のpKa値が7、もしくはそれ以上となるので、生理的なpH条件ではプロトン供与体として機能する。全く同じ考察がリシンの挙動にも当てはまり、リシンは水溶液中でのpKaが10より大きく、そのため通常では正に荷電している。ところが、非極性の環境下、もしくは正に荷電した分子が近在している場合、リシンのpKa値は6以下となり、その結果として生じる中性分子種はプロトン受容体となりうる。ヒスチジンはこの点ではおそらく、すべてのアミノ酸のうち最も多機能なアミノ酸残基であり、この事実はヒスチジン残基が酵素の活性中心に最もよく見られる残基である理由を説明する。ヒスチジンは2つの滴定可能なNH基を持ち、pKa値はそれぞれ6である。ところがNH基の片方がプロトンを失うと、もう一方のpKa値は10をはるかに上回るようになる。両方のNH基がプロトン化されると、ヒスチジンは全体として正に荷電する。また、タンパク質の主鎖から遠い方のNH基がプロトン化されると、

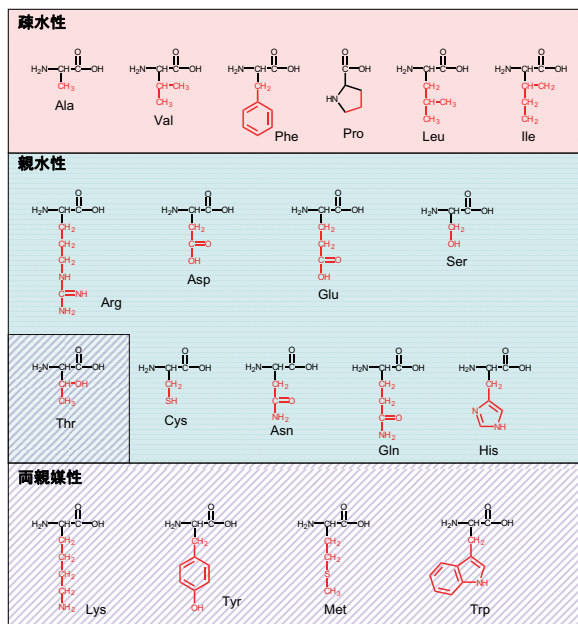


図1 アミノ酸の構造とアミノ酸側鎖の化学的特性

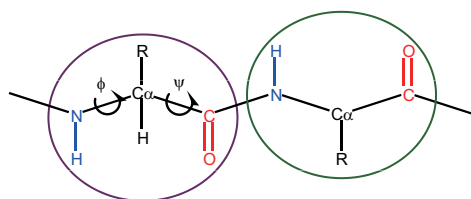


図2 ポリペプチド鎖中の2つのアミノ酸の構造

側鎖は荷電することなく、プロトンの供与体にも受容体にもなりうる。完全に脱プロトン化されるとヒスチジン側鎖は負に荷電するが、この状態になることはめったにない。アルギニンは、pHが中性である場合は常に完全にプロトン化されており、正の荷電はグアニジノ基[-NHC(=NH)NH₂]の炭素原子に主として局在している。セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギンは中性条件下でイオン化していないが、水素結合の供与と受容を同時に行うことができる。システインはヒスチジンと同じく、酵素活性部位に高頻度で見つかっており、チオラート型アニオンは天然アミノ酸に由来する最も強力な求核剤である。

両親媒性残基は、極性と非極性の双方の性質をもち、境界面形成にきわめて適している。リシンの荷電側鎖を両親媒性とみなすことは意外のようだが、その長い疎水性領域はしばしば疎水性側鎖とのファンデルワールス相互作用に関わっている。チロシンは生理的なpH条件下では通常はイオン化しないが(pKaはおよそ9)、ある種の酵素活性部位においては環境によりpKa値が低下することがあるため、酸塩基反応に関与する可能性がある。水酸基(OH)は水素結合の供与体でも受容体でもあり、芳香環は弱い極性作用をもつことがある。トリプトファンもチロシンと類似した挙動をするが、インドール環のNH基はイオン化されない。メチオニンは極性の最も低い両親媒性アミノ酸であるが、チオエーテルの硫黄原子の多くは金属イオンに対する優れたリガンドである。

タンパク質の化学修飾⁷⁻⁹

タンパク質は、20種類の異なるアミノ酸がペプチド結合で連結されたポリマーであり、それぞれ固有のアミノ酸配列、分子量およびアミノ酸配列で規定される立体構造をもち、多くのものは固有の生理機能をもつ。酵素タンパク質であれば、生体触媒としての反応特異性および基質特異性を示すとともに、エフェクターとの相互作用により触媒機能の調整を受けるものも多い。これらタンパク質の機能の本質を知るためには、その分子構造を解明し、機能(触媒能、分子識別能、調節能、抗体との結合能など)の由来する仕組みを解明する必要がある。タンパク質分子中で特に触媒機能に関わるアミノ酸残基の官能基は、その環境により他の同種の残基とは異なった異常な反応性を賦与されており、化学試薬による特異的な反応が可能である。

タンパク質の化学修飾の主要な目的の1つは、タンパク質の分子機能に関与するアミノ酸残基を同定することである。特定の残基が化学修飾を受けて機能が消失すれば、その残基は機能に関与することの一応の基準となる。

修飾を受ける残基が機能に関わる解離基であれば、修飾に伴う失活速度のpH依存性を調べ、みかけの解離定数を求めることができ、その解離基の反応における役割を解析することができる。アミノ酸側鎖官能基に対する特異性を異にする種々の試薬を用いて修飾を行ったり、同じ官能基の修飾試薬であっても分子構造やイオンの性質などの異なる試薬を用いた反応の解析を行うことで、機能に関与する部位の官能基の配置および機能発現機作などについての知見を得ることができる。さらに、2008年1月の時点で、44,742のタンパク質構造がタンパク質データベース(PDB)に登録されており、その多くのタンパク質配列エントリがSwissProtタンパク質配列データベース中にあった。タンパク質配列の数は、さらに多数の配列が決定されることが見込まれ、明らかになる配列と構造が増えるにつれて、より合理的な考察が可能となっている。

また、高次構造におけるアミノ酸残基の存在状態の識別にも化学修飾が利用される。同種のアミノ酸側鎖のうちどれが分子表面に位置し、どれが分子内部に埋もれているかなどを、特定の試薬に対する反応性の差から識別することができる。また、周囲の環境因子を鋭敏に反映する蛍光基や特別の吸収帯をもつ原子団を特定の部位に特異的に導入することにより、これらの情報基のスペクトルからそのおかれている環境をすることができ、さらにはこれをプローブとしてさまざまな条件下でのタンパク質分子の動的状態を推測することができる。

化学修飾法によりタンパク質の構造と機能との相関、アミノ酸残基の存在状態および特定の局所環境について研究を行う場合には、その修飾ではタンパク質の高次構造がほとんど変化しないということが前提となる。たとえば構造と機能との相関を調べている場合に、修飾による機能(活性)の消失(減少)が機能に関与するアミノ酸側鎖の修飾に基づくものであると判定を下す前に、タンパク質の立体構造の変化がないことを確かめる必要がある。修飾による官能基の構造変化や性質の変化が周囲の原子団に影響を与えることは否めない。局所的な構造変化ができるだけ小さいことが望ましいが、少なくとも分子全体の立体構造に殆ど影響がないことを確かめる必要がある。

化学修飾法は上に述べた目的以外にも用いられており、例えば、塩基性基や酸性基の置換によるイオンの性質の改変や放射線標識に利用されている。また、分子内架橋によるタンパク質分子の安定化や酵素抗体法における異種生理活性タンパク質間の架橋反応においては、2価性試薬が用いられている。これらの修飾においては、それほどの厳密性は要求されないが、試薬はできるだけ穏和な条件下で修飾を行える反応性基をもち、特異的に架橋反応

できることが必要である。架橋試薬はサブユニットから形成されたタンパク質（リボソームやウイルスを含む）の空間配置の解析に用いられている。

タンパク質の化学修飾試薬は、構造的立場から2つのタイプに分類することができる。1つはこれまでに述べたアミノ酸側鎖特異性試薬、2つ目はタンパク質の特定部位に反応する親和性標識試薬である。前者は特定の官能基に高い反応性を示す試薬であるのに対して、後者は、対象とするタンパク質の機能部位と特異的に相互作用しうる構造をもった物質、すなわち親和性リガンドに修飾反応に直接関与する反応基を導入したもので、タンパク質とリガンドが複合体を形成した後に修飾反応が起こる。タンパク質分子の特定の部位と試薬分子の配向や反応に関与する官能基間の近接効果を考慮するもので、特定の残基が修飾される確立が高い。本稿では、主にアミノ酸側鎖特異性試薬による修飾反応について述べる。

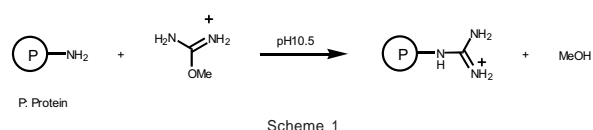
アミノ酸残基の化学修飾法⁷⁻⁹

タンパク質に存在する官能基と反応する化学試薬は多いが、それぞれの官能基に選択的に反応する試薬は必ずしも多くない。タンパク質の化学修飾は、原則として特定の官能基に対する選択的な修飾反応が大切であり、修飾の目的に合った試薬を選び、反応条件を設定して修飾を行う。そこで、アミノ基、カルボキシル基をはじめグアニジノ基（アルギン残基）、イミダゾール基（ヒスチジン残基）、インドール基（トリプトファン残基）、フェノール基（チロシン残基）、チオエーテル（メチオニン残基）、水酸基（セリン残基）およびチオール基（システイン残基）の修飾法について以下述べる。

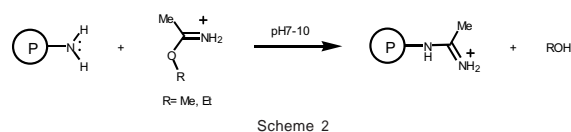
アミノ基：アミノ基はタンパク質分子内の官能基のうちでも、生理的条件下で正の電荷を担い、主として表面に露出している。正の電荷のためにタンパク質の水溶液中での安定性に寄与しており、また、場合によっては酵素やインヒビターなどの活性発現部位として、あるいはアロステリック部位として重要な役割をもっていることが知られている。そのため、化学修飾の対象としても種々の試薬によって古くからよく研究されている。タンパク質の機能性解析のために化学修飾としては、電荷をそのままにする修飾としてグアニジル化、あるいは逆転させる修飾としてスクシニル化など多様性に富んだ手法がある。タンパク質分子内のアミノ基（-NH₂）は2種類あり、1つはN末端のα-アミノ基であり、もう1つは分子内に比較的多いリシンのε-アミノ基である。それらは反応性の高い求核性であるので、多くの修飾試薬を用いることができる。また、アミノ基の電子状態を変

えることによってその求核性を上げることも下げることも可能である。つまりアミノ基の反応pHをコントロールすることによって解離か非解離の電子状態にすることが可能であり、反応のpHをpKaより高くすればアミノ基の求核性が高まり、一般により多くの試薬に対して反応する。したがって、α-アミノ基のpKaとε-アミノ基のpKaが、それぞれ約6~8と8~10の間にあることを考えると、アミノ基の少ないペプチドホルモンなどではα-アミノ基に対してε-アミノ基よりもより選択的に修飾することも可能であるが、アミノ基の数が多くなるに従ってε-アミノ基の局所環境の多様性が増加し、pKaも広い範囲にわたるために選択的な反応を行うことが困難となる。また、アミノ基はタンパク質中に数が多いことから、¹⁴Cや³Hを用いた放射標識、あるいは蛍光試薬を用いた蛍光標識の部位をして推奨される残基である。アミノ基を¹⁴Cや³Hで標識したものは、チロシン残基を¹²⁵Iや¹³¹Iによって標識したものよりは半減期が長く安定な点で有利である。さらに、残基数が多いことは、たとえばN末端のように抗原性などに無関係なものも多く抗原性をそこなうことなく標識したい場合には有用であると考えられる。

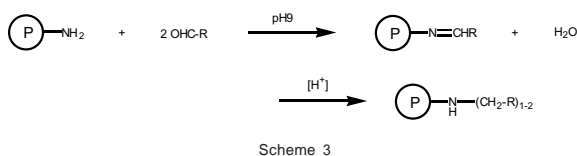
アミノ基の正の電荷をそのままに温存し、なおかつ比較的小さな修飾を行いたい場合の方法の1つにグアニジル化がある。これは、O-アルキルイソ尿素を用いてアミノ基を修飾する方法である。一般によく用いられるのは、O-メチルイソ尿素である。この反応の反応性は比較的高く、特異性も比較的によい。しかし、反応のpHが高い（pH10.5）ので制約がある。また、得られたグアニジノ基は、アミノ基よりpKaが2~3高くなる（Scheme 1）。



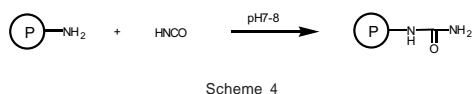
O-メチルイソ尿素を用いるグアニジル化反応と類似の反応で、イミドエステル（多くはメチルまたはエチルエステル）を用いて行うのがアミジン化である。アミジン化反応は、グアニジル化より穏やかな条件（pH7~10）で、しかも速く進むが、pH依存性が極めて強い。したがって、適当なpHを選ぶことによってアミジン化の反応速度をコントロールし、目的に合った修飾を行うことが可能である（Scheme 2）。



還元アルキル化は、タンパク質のアミノ基にアルデヒドを作用させ、水素化ホウ素ナトリウムによって-NH-CH₂-R を生成する反応である¹⁰。反応試薬には脂肪族アルデヒド、カルボニルを含むケトンなどが使われるが、アミノ基の修飾にはホルムアルデヒドが最もよく用いられている。生成物は主に N,N-ジメチル誘導体となり、6M HCl 加水分解後、アミノ酸分析計でジメチルリジンとして定量することができる。生じたジメチルアミノ誘導体の pKa は、もとのアミノ基より0.6~0.6程度低くなるが、他の方法よりも pKa の変動が少なく有利である。さらに、メチル基そのもののサイズがそれほど大きくないのは利点であるが、反応の収率はあまりよくない。この反応は pH 依存性が強く、pH6 ではまったく反応が進行せず、通常 pH8 以上で行う必要がある (Scheme 3)。

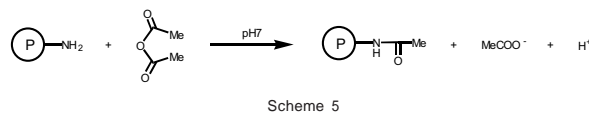


シアナートイオンはタンパク質中の多くの官能基と反応するが、とりわけ中性付近でプロトン化していないアミノ基と反応して安定な化合物を与える¹¹。反応にはカルボキシル基を有する緩衝液は用いず、ホウ酸緩衝液がよく用いられる。通常用いられるシアン酸カリウム (KNCN) は水に極めて溶けやすく便利である。その濃度が0.2M 以上ではチオール、イミダゾール、フェノキシおよびカルボキシル基とも反応するが、それらの多くは比較的不安定な化合物を生じるため分離精製の途中で中性~弱塩基性で外れてしまう。露出した遊離アミノ基に対する反応速度は、そのアミノ基の pKa と log k = 7.94 - 0.71 pKa (k は 2 次反応速度定数、M⁻¹min⁻¹) のような関係があることが知られている¹²。したがって、pKa で 2 単位の差は約100倍の差となり、アミノ基のうちでも -アミノ基の方が -アミノ基よりもはるかに反応性が高く、pH7 以上で100倍の差が見られる。pH5 前後ではカルボキシル基と混合酸無水物を生じ、それらがさらに重合物を生成する可能性があるが、pH7~8 ではそのような副反応は起こらない。このアミノ基の修飾法は、さらに発展してアミノ末端の分析みの応用されている (Scheme 4)。



次に、古くから用いられている方法として、アセチル化がある。本反応の結果、アミノ基の極性は失われ電荷はゼロとなる。無水酢酸との反応では、反応は pH が中

性から弱塩基性で比較的穏和な条件で進行するので有用である。この試薬は水に難溶で、容易に分解して酢酸となるので低温で数回に分けて過剰に加え、反応させる。その際、無水酢酸の過剰量を一度に加えるとタンパク質の変性が起こることに留意しなければならない (Scheme 5)。



N-アセチルスクシンイミド(1)、あるいは N-ヒドロキシスクシンイミドアセテート(2)¹³では、中性付近の pH で反応性が高く、その分解は緩やかに起こり、リシンに対する選択性も高い。しかしながら、類似の試薬 N-アセチルイミダゾール(3)はチロシンに対する反応性が高く、アミノ基の修飾には不向きである (図3)。

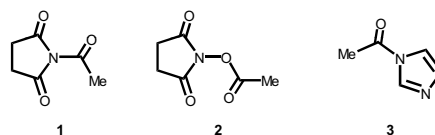


図3 スクシンイミドの構造

スクシニル化はアセチル化の1つであるが、多くのタンパク質について、しばしば有用である。この反応は通常用いられる無水コハク酸は固体の結晶物で、比較的安定で、反応条件は非常に緩和で、操作も簡単である。アミノ基に対する特異性も高いが、チオール基、イミダゾール基、水酸基との反応も知られている。反応は弱塩基性で進行し、アミノ基との反応の結果、正の電荷が逆転して負の電荷が付加する。すなわち、アミノ基1個につき見かけ上2個の正の電荷が減少する。したがって、修飾されたタンパク質の等電点は、より酸性に移行する。修飾を受けたタンパク質の溶解度は、アセチル化物よりも高い。負の電荷が増加するため陰性電荷同士が反発し、タンパク質分子全体は見かけ上膨張する。その結果として、サブユニットが会合してできているタンパク質ではサブユニットの解離が生じる^{14,15}。また、膜タンパク質などのように疎水性が強く水に難溶なもの場合は、可溶化の手段として有用である。このような場合、タンパク質全体のコンフォメーションの変化などを伴ったもの^{16,17}とそうでないもの^{18,19}がある。アミノ基以外でチオール基が会合に関与しているような場合には、静電的な反発以外に、S-スクシニル化の解離のために重要になることが考えられる。また、タンパク質のアミノ酸配列の決定などに際しては、スクシニル化の別の有用性が挙げられる。すなわち、多くの場合、トリプシンによる限定分

解を行い、トリプシンペプチドを与えるが、このときリシンの γ -アミノ基をブロックすることによってアルギニン残基のところでのみ切断したペプチドを得ることができる。その時、リシンをアセチル化した場合は溶解度が低くなるが、スクシニル化した場合は溶解度が高く好都合のことが多い。一般に、スクシニル化したタンパク質は、pH7以上で可溶である (図4)。

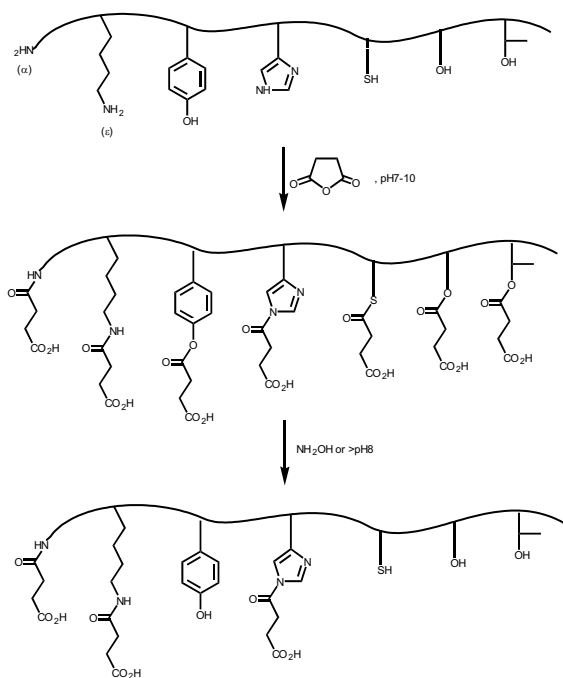
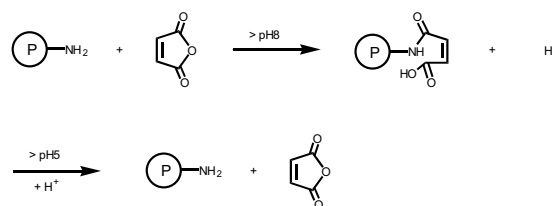


図4 無水コハク酸によるアミノ基のスクシニル化とそれに伴う各種アミノ酸側鎖との副反応

アミノ基を反応性と選択性の高いマレイル化試薬によって反応させて保護したのち、他の残基を別の試薬で修飾し、その後、アミノ基について保護基を可逆的に脱離させることができる。例えば、トリプシンの特異的な切断部位であるリシン残基とアルギニン残基のうち、リシン残基をマレイル基で保護し、得られた γ -マレイル化リシンを含むペプチド結合はトリプシンに対して安定で、基質とならず分解を受けない。これにトリプシンを作用させるとアルギニン部位でのみ切断が起こり、C末端にアルギニンを持つマレイル化リシンを含むペプチドを単離することができる。次いで、マレイル保護基を脱離させたのち、このものをさらにトリプシン消化することでリシンのC末端で切断する利用法が可能である。このように可逆的に保護基の脱離とアミノ基の再生が容易であることは、構造活性相関や構造解析に有用である²⁰。スクシニル化と同様、マレイル化によって電荷は逆転するので、イオン交換クロマトグラフィーや電気泳動での分離は容易である。また、スクシニル化合物と同様、溶

解度も上がる (Scheme 6)。



Scheme 6

マレイル化以外にジケテン(4)によってアミノ基のアセトアセチル化を行い、さらにヒドロキシアミンによって脱アセチルを行うことが報告されている²¹。また、2-メトキシ-5-ニトロトロポロン(5)は緩やかな条件でアミノ基にほぼ特異的に反応し、しかもチオール基とは反応せず、1~2MのヒドラジンによってpH8.5~9で脱ニトロトロポニルが出来る点が有用である^{22,23}(図5)。

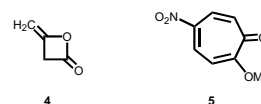


図5 ジケテンと2-メトキシ-5-ニトロトロポロン

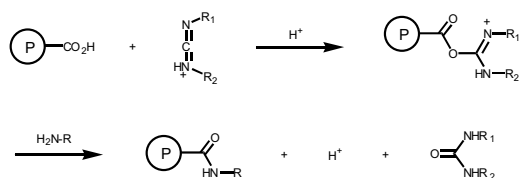
アミノ基の脱アミノ化反応は古くから亜硝酸を用いて行われていたが、その反応が γ -アミノ基に対して比較的特異性が高いことが見出され、トリプシン²⁴、エラスターゼ²⁵、キモトリプシン²⁶、ペプシン²⁷、ネオカルチスタン²⁸、インスリン²⁹などに応用されている。さらにカルボニル化合物との反応は自然界でタンパク質のアミノ基が最もよく遭遇している反応であり、その実用的な応用もホルムアルデヒドなどについていえば、タンパク質化学以前から知られていたものである。また、タンパク質にジニトロフェニル (DNF) 基またはトリニトロフェニル (TNP) 基を結合させることにより、そのタンパク質の抗原性を高めたり、あるいはDNP基またはTNP基に対する抗体を作ることがあり、これは免疫学的な観点からは有用である。また、TNP化はアミノ基の定量法としても重要である。さらに、TNP化に基づくアミノ基の定量法で、ニンヒドリン法などよりも反応が穏やかで、分離操作も加熱も不要な方法としてトリニトロベンゼンスルホン酸によるアミノ基の定量がある。

カルボキシル基：タンパク質中のカルボキシル基には、アスパラギン酸残基の γ -カルボキシル基、グルタミン酸残基の γ -カルボキシル基、さらにC末端アミノ酸の α -カルボキシル基の3種類がある。これらのカルボキシル基は、タンパク質に陰性電荷を付与し、極性を高めて水溶液への溶解度を大きくするのに寄与している一方、基質との結合や触媒作用の発現に関わるなど、タンパク質の立体構造の保持や機能発現のために重要な官

能基の1つである。カルボキシル基の修飾法の主要なものとしては、アミド化、エステル化、還元アルコール化の3つに分けられる。いずれの方法も、条件を選べばカルボキシル基の完全な修飾を行うことができる。

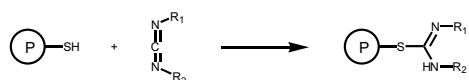
まず、アミド化の方法として、タンパク質のカルボキシル基の修飾は、1945年にはじめて Fraenkel-Conrat らによって報告されたが、その方法は乾燥した塩化水素 - メタノール中でタンパク質のエステル化を行うものであった。この方法は収量もよく反応性も高く、手近に行えるという利点はあるが、高濃度のメタノールと塩化水素の存在下で行うため、多くの生理活性を有する安定性の低いタンパク質にとっては過酷な条件であった。さらに、不溶化するタンパク質が多いことに加えて、非水溶媒による変性と酵素などの不活性化、脱アミド化と部分的エステル化反応 (Asn Asp-OMe, Gln Glu-OMe など)、セリン、スレオニン残基における N O 転移反応などが起こる可能性があったため、広範な応用には限界があった。

1966年に Hoare と Koshland らは、カルボジイミド³⁰を用いてカルボキシル基の修飾をより緩和にかつ系統的に行うことを検討し、実用的な方法を開発した³¹。この方法では、水溶性カルボジイミド (例えば、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩) によってカルボキシル基を活性化し、任意のアミン成分 (例えば、塩化アンモニウム、グリシンアミド、グリシンメチルエステル、アミノメタンスルホン酸など) と pH4.7前後で水溶液中で反応させる。反応を中止させるには1M 酢酸などを反応液に加える (Scheme 7)。



Scheme 7

カルボジイミド法は、副反応が少ないと考えられているが、パパインに修飾を応用した場合、カルボキシル基以外の残基との予想外の反応が見出されている^{32,33}。これは、活性中心にある Cys25 のチオール基とカルボジイミドとが付加反応を起こし、非可逆的に不活性化されていた (Scheme 8)。



Scheme 8

また、19個のうち9個のチロシンの水酸基にも、グリシル化が進行したが、ヒスチジンとは反応しなかった。

パパインの例では、基質の競合阻害剤であるベンズアミドアセトニトリル存在下の修飾では活性中心のチオール基と本来修飾されるべき2個のカルボキシル基の修飾は保護された結果が得られている。

酵素の基質特異性で正の電荷を好む性質を有する場合 (例えば、トリプシンなど)、多くはカルボキシル基がその酵素活性に関わっていることが示唆されるが、その活性に関与するカルボキシル基を選択的に修飾することは容易ではない。そのような中で、イソオキサゾリウムは正の電荷を有しており、実際に pH3~5 の範囲で他の残基を修飾することなくトリプシン活性中心のカルボキシル基を修飾することができる。Woodward 試薬を含むいくつかのイソオキサゾリウム塩 (6~9) を用いて検討され成功している (図6)。

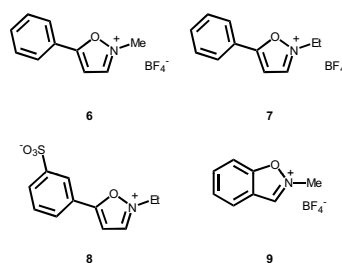


図6 カルボキシル基の修飾に用いられるイソオキサゾリウム塩

これらの試薬による修飾速度は経時的に低下することが知られており、その理由としては、試薬の水溶液中での安定性が悪く、分解するためと考えられている³⁴。

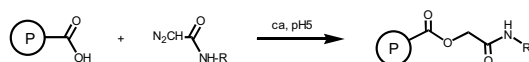
その他のアミド化の方法として、液体アンモニアを用いる方法がある。これは、あらかじめエステル化したタンパク質を液体アンモニア中で加アンモニア分解するか、あるいは液体アンモニア中で直接エステル化とアミド化を行う方法である。

次に、エステル化の方法として、1945年に Fraenkel-Conrat と Olcott らによって開発された塩化水素 - メタノール法には、前述したように、脱アミド反応、ペプチド結合の N O 転移、非可逆的な変性など、いくつかの問題があるが、生理活性や酵素活性をあまり問題にしない場合で、完全にメチル化を行いたい場合や、高濃度の塩化水素とメタノールでも安定なタンパク質であれば、最も簡単に行えるカルボキシル基の修飾方法である。本法の特徴はほとんどすべてのカルボキシル基が定量的にエステル化されうることであり、この点では、他の方法よりは信頼性があり、よく用いられている。しかしながら、コンフォメーションは当然変化することが予想される (Scheme 9)。



Scheme 9

ジアゾ酢酸類は、タンパク質のカルボキシル基をエステル化できるが、その中でもジアゾ酢酸メチル、ジアゾアセトアミド、およびアゾアセチルグリシンアミドがよく知られており、特に後2者が好まれている (Scheme 10)。これらの試薬を用いるに当たっての注意点は、イオン化および非イオン化状態のカルボキシル基のみならず、その他多くの負の電荷をもつ無機イオンとも反応する点である。たとえば、塩素イオンは反応してクロロアセチル化物となる。しかし、過塩素酸イオンは反応せず、そのため反応溶液に用いる事ができる。また、ジアゾ酢酸類は水分子と反応してグリコールを生成するので、カルボキシル基のエステル化の程度を高めたいときは、高濃度の試薬を用いる必要がある。



Scheme 10

ジアゾ酢酸類と同様に、ジアゾメタンもカルボキシル基のエステル化に用いられる。ジアゾメタンの反応性は一般に緩和であり、収率は低い。応用例としては、キモトリプシノーゲンA³⁵、リボヌクレアーゼ³⁶、およびウサギIgG³⁷などがあり、試薬を0.4~0.8mol/l消費した場合に上記のタンパク質はそれぞれpH5.5, 4.5, 5.5において、カルボキシル基は約16%, 25%, 20%のエステル化が進行した。

トリエチルオキシニウムフルオロボレート [(C₂H₅)₃O⁺BF₄⁻]によるカルボキシル基のエチルエステル化はよく知られているが³⁸、この試薬の特徴は、カルボキシル基のpKa値が低いほど反応性が高いことである。その理由としては、オキシニウムイオンが未解離のカルボキシル基よりもイオン化したカルボキシル基に対しての方が電気的な親和性が強いと考えられている。もちろん、局所の立体障害によって左右されることは十分考えられるが、特定のカルボキシル基の選択的修飾の目的のためには有効である。本法は、pH2~7の緩和な条件下で進行するが、pHは高めの方がよく進行する。副反応としては、非特異的なメチオニンのエチルスルホニウムの生成およびヒスチジンのエチルイミダゾリウム塩の生成が知られている。応用例としては、トリプシン³⁹およびペプシン⁴⁰などがある。

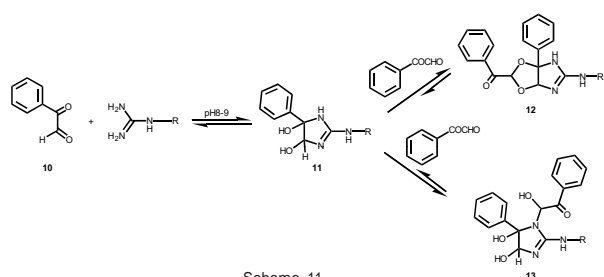
これまで記した方法によるカルボキシル基のアミド化あるいはエステル化は、いずれも酸や塩基に不安定であり、親水性が低下して溶解度に変化をきたすことや、エステル基などがかさばって立体的に障害を起こす可能性が考えられる。また、アミド化あるいはエステル化反応

の多くは、反応率が低い、副反応、あるいは分子内架橋などの問題がある。このような問題点を解決するために Atrassi と Rosenthal らは、カルボキシル基のジボランによる還元的修飾反応をより発展させ、タンパク質への応用を試みた⁴¹。カルボキシル基が本法で還元されるためには、プロトン化していることが必須の条件であり、-10~0 で注意深く行えば、ペプチド結合やカルバミド残基の還元は起こらず、比較的限定されたカルボキシル基が反応することができる。室温より過酷な条件では、ヒスチジン、アルギニンおよびプロリンが修飾を受け、もちろん、シスチンのS-S結合は開裂された。応用例としては、 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) の同定や、ガストリンアナログおよびウシIgGにおけるN末端のピログルタミン酸の同定がある^{42,43}。

グアニジノ基 (アルギニン残基) : アルギニン残基は側鎖に塩基性の強いグアニジノ基 (pKa>12) をもち、生理的条件下では常にプロトン化型で存在している。この残基は一般にタンパク質分子の表面に存在しており、グアニジノ基は溶媒の水分子に接しうる状態にあると考えられている。そのため、アルギニン残基の修飾は緩和な条件で行う事ができ、しかも用いられる修飾試薬も無差別にアルギニン残基と反応するほど強力でない、適当な条件下では、反応しやすい限られた残基だけを修飾することが可能である。特に、アルギニン残基はヌクレオチドなどリン酸イオンを含む物質と相互作用するタンパク質においては、リン酸イオンと結合に関与すると推定されており、この残基の限定的な修飾がこれからのタンパク質の機能に大きな役割をおよぼす可能性が示唆される。

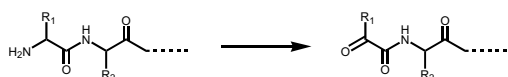
アルギニン残基の修飾試薬としては、2,3-ブタンジオン (ジアセチル)、1,2-シクロヘキサンジオンなど β -ジケトン類やフェニルグリオキサールなどの α -ケトアルデヒドが用いられており、弱塩基性条件下でタンパク質と反応させる。これらの β -ジカルボニル化合物のグアニジノ基との反応性はそれほど小さくなく、修飾反応において大過剰の試薬を用いてもすべてのアルギニン残基が反応することはまれである。

アルギニン残基は、フェニルグリオキサール(10)によりpH8~9において修飾される。その際、アルギニン残基1個当たり2分子の試薬が反応する。修飾生成物として2種類の化合物(12, 13)が推定されるが、12の可能性が大きい。この試薬による修飾では¹⁴C標準試薬が容易に使用でき、修飾生成物も塩基性に長時間さらされないかぎり安定であるので、修飾残基の同定を行いやすい。しかし、修飾の結果、アルギニン残基に2つのベンゼン環が導入されるので、修飾残基近傍の構造が局所的にかなり影響を受けるのはまぬがれない (Scheme 11)。



Scheme 11

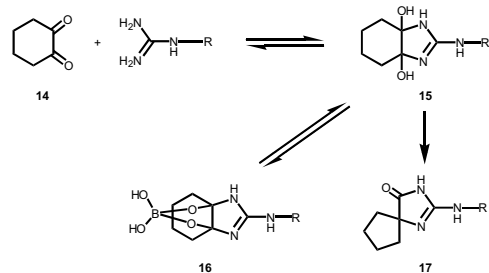
フェニルグリオキサールによる修飾を緩和な条件で行う限りでは、タンパク質中のアルギニン残基だけが反応するが、試薬濃度を大きくするなど条件を過酷にするとアミノ末端の脱アミノ反応を起こしやす。その結果、アミノ末端は α -ケト酸残基に変化する (Scheme 12)。



Scheme 12

リボヌクレアーゼ A のアミノ末端リシン残基は、1.5% フェニルグリオキサールと pH8.0、25℃ で反応し、60 分後には殆ど全部が脱アミノ化される⁴⁴。同様に、ジスルフィド結合を還元後 S-カルボキシメチル化したインスリン B 鎖の末端フェニルアラニン残基、 α -キモトリプシン C 鎖の末端アラニン残基もこの試薬と反応するが、トリプトファンや α -キモトリプシン中のイオン対を作っているイソロイシン残基の α -アミノ残基は反応しない⁴⁵。フェニルグリオキサールは、このほかりシンやシステインとも反応するが、普通用いられる条件ではこれらの残基への顕著な修飾はほとんど報告されていない。たとえば、クレアチンキナーゼの 1 残基のシステインは一般のチオール試薬と反応するが、フェニルグリオキサールにより修飾はされない⁴⁶。しかし、ロダネーゼの Cys247 は KCN 存在下 pH7.8 で小過剰のフェニルグリオキサールと反応させると、近傍のチオール基とジスルフィド結合を生成する⁴⁷。この際、Cys247 と架橋する残基は Cys263 である。

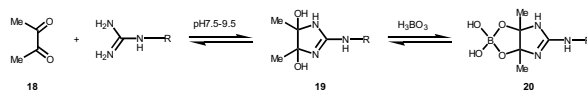
次に、1,2-シクロヘキサジオン(14)は、強塩基性でアルギニン残基の Guanidino 基と反応して *N*-(4-オキソ-1,3-ジアザスピロ[4,4]ノニリデン-2)オルニチン残基(17)を生成する⁴⁸(Scheme 13)。



Scheme 13

この反応では中間体として *N*⁸-(1,2-ジヒドロキクロヘキシレン-1,2)アルギニン(15)が生成するが、ホウ酸イオンが存在するとその *cis*-グリコール部分がホウ酸付加物(16)を生成して安定化すると考えられている。Patthy と Smith は、この安定化を利用し、pH8~9 でアルギニン残基だけを選択的に修飾する方法を確立した^{49,50}。

次に、Yankeelov は、アルギニン残基の 2,3-ブタンジオンによる修飾には、試薬として単量体より反応性の大きい三量体や二量体が有効であること明らかにし^{51,52}、リボヌクレアーゼ A やウシ血漿アルブミンの修飾に用いたが、この方法ではリシン残基への副反応やアルギニン残基の修飾生成物が単一でないなど満足すべき結果ではなかった。その後、Riordan は、2,3-ブタンジオンの単量体(18)を弱塩基性のホウ酸緩衝液中で直接カルボキシペプチターゼ A と反応させてアルギニン残基を修飾すると酵素活性が変化することを見出した⁵³。ホウ素イオンは 1,2-シクロヘキサジオンによる修飾と同じく、試薬と Guanidino 基との反応により生成する 4,5-ジヒドロキシ-4,5-ジメチルイミダゾリン誘導体(19)の *cis*-グリコール部分と錯体(20)を生成して 19 を安定化して修飾反応を促進すると考えられている (Scheme 14)。



Scheme 14

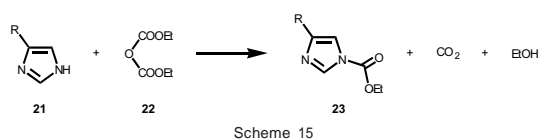
したがって、ジヒドロキシイミダゾリン誘導体(19)が主生成物である反応段階で修飾を停止するためにホウ素イオンを系外に除くと、ホウ素錯体(20)は分解してもとのアルギニン残基を再生する。いいかえると、修飾反応が短時間に行われるときには、アルギニン残基の 2,3-ブタンジオンによる修飾を可逆的に行うことができる。

イミダゾール基 (ヒスチジン残基) : ヒスチジン残基は、タンパク質の機能に直接関与する残基として最も代表的なものであり、タンパク質の機能に関わる官能基を明らかにしようとするときには、この残基の側鎖のイミダゾール基が化学修飾の対象となることが多い。イミダゾール基は中性付近に解離平衡をもち、酸化や還元に対して抵抗性を示す安定なヘテロ環である。ヒスチジン残基の修飾法として、ジエチルピロマルボネートによる *N*-エトキシホルミル化、光増感酸化、ヨード酢酸による *N*-アルキル化、ジアゾテトラゾールによる *C*-ジアゾ化などが報告されている。

タンパク質の機能発現にヒスチジン残基が直接関与する例として、Schneider は約 80 種の酵素やタンパク質を挙げており⁵⁴、この事は、酵素の活性部位には中性付近の解離定数をもつヒスチジン残基が存在する割合が多い

ことを示唆している。ヒスチジン残基のもつこのような特性は、この残基には他の残基とは異なった修飾法が適用できることを示しており、タンパク質との特別な親和性をもつ試薬による親和性標識を利用できることを表している。しかし、この修飾法においても親和性をどのように利用するかは修飾試薬の構造に左右され、基質とほとんど同じ構造をもつ試薬をつかって酵素の活性部位の限られた位置の官能基を修飾できるほか、基質の一部と類似の構造をもつ試薬によりことな位置の官能基の修飾も可能である。

ヒスチジン残基の一般的な修飾法として、ジエチルピロカルボネート (DEP, 22) によるイミダゾール基のN-エトキシホルミル化(23)反応がある (Scheme 15)。



この反応では、DEP がプロトン化していない側鎖のイミダゾール基(21)と反応するので塩基性で修飾を行うのが有利であるが、試薬や生成するN-エトキシホルミル基が塩基性で不安定であるため、通常、反応は室温、pH6.0~6.5で行われる。また DEP は加水分解されやすいのでヒスチジン残基量より過剰の試薬が用いられ、多くの場合、イミダゾール基のエトキシホルミル化反応は速く、実際には修飾反応の時間としては、数分~1時間で行う。この様な条件のもとでは DEP はタンパク質中の一部のヒスチジン残基を修飾するだけであり、ヒスチジン残基全部の修飾には尿素や SDS でタンパク質を変性させた状態で反応を行う必要がある。

DEP は修飾試薬としては求核性基と反応するごく一般的なアシル化剤であり、試薬自身がイミダゾール基に特異的な親和性や反応性をもつ試薬ではない。そのため、ヒスチジン残基に優先的に反応させるため、弱酸性で低濃度の試薬を限られた量だけ用いて、リシン、チロシン、システインの各残基への修飾を相対的に抑えるように条件を設定して、タンパク質と反応させる。多くの場合、タンパク質中のイミダゾール基の反応性が低分子のイミダゾール化合物より高く、ヒスチジン残基の優先的なN-エトキシホルミル化が行われるが、タンパク質によっては、ヒスチジン以外の残基の部分的な修飾が避けられないことがある。さらに極端な場合では、目的とするヒスチジン残基がまったく修飾されず、他の残基だけが修飾されることがある。ペプシンの α -アミノ基⁵⁵、ホスホリパーゼ A₂の β -アミノ基⁵⁶やキモトリプシンの Ser195の水酸基⁵⁵などがその例である。その他、まれにトリプトファン⁵⁷やアルギニン⁵⁸も修飾される。

また、メチレンブルー(24)やローズベンガル(25)を増

感剤として中性から塩基性においてタンパク質の光酸化を行うと、ヒスチジン残基が優先的に酸化される場合が多い (図7)。このような選択性は、ヒスチジン残基のイミダゾール基が分子の表面に露出しているときには、このアミノ酸がメチオニン、トリプトファン、チロシンに比べて酸化速度が大きいと考えられている⁵⁹⁻⁶¹。

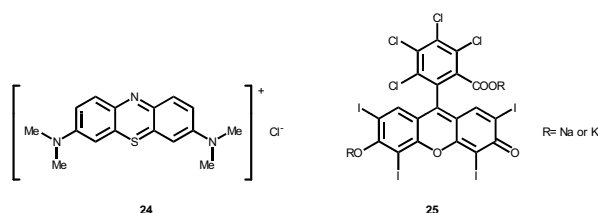
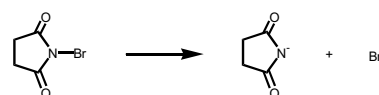


図7 増感剤の化学構造

インドール基 (トリプトファン残基) : 各種タンパク質のアミノ酸組成をみると、トリプトファンの含有率はメチオニンと同様に最も低い部類に属する。トリプトファン残基は、かさばったインドール環に基づく相互作用によりタンパク質の高次構造維持に貢献しているものと考えられている。また、基質結合部位にあって、基質との結合に重要な役割を果たしているものもあり、パパイニン⁶²の Trp69および177、キモトリプシン⁶³の Trp215、リゾチーム⁶⁴の Trp62、ブタ膵臓ホスホリパーゼ A₂⁶⁵の Trp3などがある。

N-ブロモスクシンイミド (NBS) は2つのカルボニル基の電子吸引性に基づいて、臭素陽イオンを放出し、酸化反応を行う (Scheme 16)。

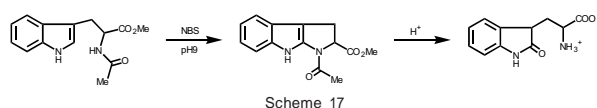


Scheme 16

NBS によるタンパク質の修飾の目的は2つあり、第一はトリプトファン含有の定量であり、第二はトリプトファン残基の修飾と活性の相関を調べて、トリプトファン残基のそのタンパク質機能への寄与を調べることである。トリプトファン残基のタンパク質機能への寄与については、酸化トリプトファン残基数との活性相関が知ればよい。タンパク質1mol 当り1mol のトリプトファンが修飾を受けて活性が消失すれば、特定のトリプトファン残基の特異的修飾の可能性を示唆する。

NBS によるトリプトファンの修飾は、Patchornikら^{66,67}により紹介されたが、トリプトファン含量の測定と同時に、トリプトファン残基のカルボニル基が関与するペプチド結合の切断に関するものであった。この化学的切断は長鎖ペプチドとしては最初にアミノ酸29個より

なるグルカゴンに対して試みられ、pH4.0で3.5~5倍 mol の過剰量の NBS を使用したとき、開裂率は 6 ~ 14% であった。その後かなりの数のタンパク質について開裂が調べられたが、収率が満足できるものは殆どなく、現在では開裂を目的とした NBS の反応は殆ど行われていない。NBS によるタンパク質の修飾反応は、主として酸性 pH 条件で行われ、オキシトリプトファンが生成される。pH を上げると反応効率が落ちるが⁶⁸、中性近くでは少量の NBS による選択的修飾も可能である。弱塩基性溶液で *N*-アセチル-L-トリプトファンメチルエステルを 1 当量の NBS で酸化すると、好収率でしかも瞬時に 2,3-ジヒドロピロ[2,3-*b*]インドール誘導体を与える⁶⁹。この反応は α -アミノ基の関与するペプチド結合に回転の自由度がある時に限られており、短いペプチドに限られた反応である (Scheme 17)。



NBS の関連化合物として、濃厚尿素溶液に NBS を作用させる *in situ* 合成で得られる *N*-ブromo尿素が、トリプトファンペプチドのより穏やかでより選択性開裂試薬として報告されている⁷⁰。*N*-ブromoアセトアミド⁶⁶は、NBS に比べると作用力が弱い。トリプロモクレゾールや *N*-クロロベンゾトリアゾール⁷¹も NBS と比べてより穏やかな試薬である。2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチルインドールに NBS を作用させて得られる 2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3-プロモインドレニンは、NBS より選択的な試薬である⁷²。本試薬を 10 倍 mol 量の 50% 酢酸中で作用させたとき、トリプトファンが完全に消失し、メチオニンがメチオニンスルホキシド、システインがシスチンに酸化されるほか、他のアミノ酸に変化は認められなかった。30 倍 mol 量で 20 時間の反応ではチロシンに 14% 程度の減少が見られた。対照とした NBS では、トリプトファンの他にチロシン、ヒスチジン、メチオニンおよびシステインが完全に消失する結果となった。

NBS 以外の修飾法としては、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミド、アリールスルフェニルクロリド、ホルミル化、オゾン酸化がある。まず、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミド (HNB-Br) は、酸性条件下では、チオール基を除けばトリプトファンに対して特異的な試薬である⁷³。塩基性 pH ではフェノール性水酸基とも反応するようになる。この試薬の反応性の大きいことは、次に示す共鳴によるカルボニウムイオンの安定化によるものと考えられている (図 8)。

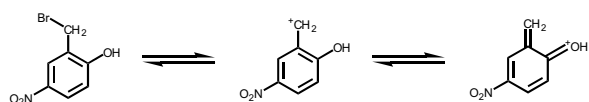
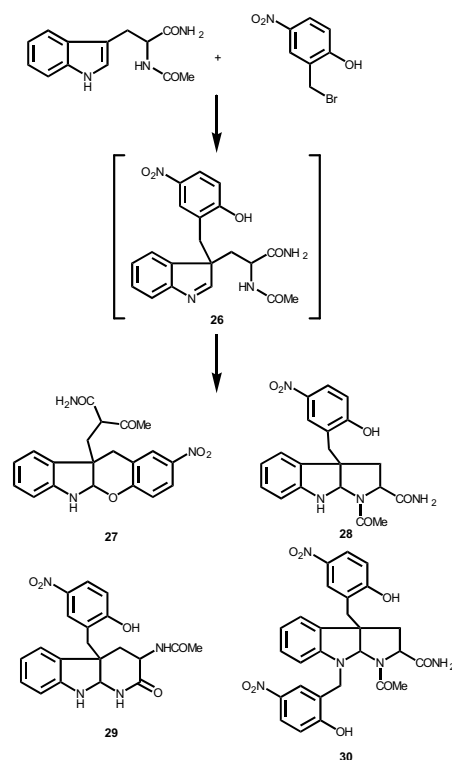


図 8 カルボニウムイオンの安定化

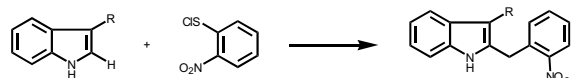
この試薬は、したかつて水とも反応し、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルアルコールを与える。トリプトファン残基との反応では、HNB-Br がまずインドールの 3 位を攻撃して中間体インドレニン誘導体(26)を生成し、これが種々の転移反応をおこし 27~29 のモノ置換体を与え、さらにジ置換体(30)も生成する (Scheme 18)。



HNB-Br は水溶液には溶けないので、水と混ぜりうる有機溶媒に溶かしてタンパク質溶液に加える。溶媒としては、アセトン、ジオキサン、ジメトキシエタンなどが用いられており、メタノールでは加溶媒分解が起こることが知られている⁷⁴。HNB-Br の関連化合物として、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルクロリド (HNB-Cl)、2-メトキシ-5-ニトロベンジルブロミド、2-アセトキシ-5-ニトロベンジルクロリドおよびジメチル-(2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジル)スルホニウムクロリド (MHNBS-Cl) などがある。HNB-Cl は HNB-Br と同等の性質を示し、2-アセトキシおよび2-メトキシ誘導体は HNB-Br と比べて反応性においては劣り、水に対する溶解性も悪くなる。MHNBS-Cl はインドール核をアルキル化するとともにジメチルスルフィドを遊離し、反応性では HNB-Br と

比べて劣るが、水溶性という利点があり、酸性 pH においてはかなり安定である。アミノ酸側鎖特異性は HNB-Br と同様であって pH4 ではメチオニンやチロシンとは反応しない。

アリールスルフェニルクロリド類は、酸性条件下で、トリプトファンとチオール基とのみ反応する特異性の高い試薬である⁷⁵⁻⁷⁷。アリールスルフェニルクロリドは、トリプトファンのインドール核の2位と反応し、チオエーテル結合を形成し、アリールスルフェニルトリプトファンを与える (Scheme 19)。



Scheme 19

修飾に用いられるアリールスルフェニルクロリドは、2-ニトロフェニルスルフェニルクロリド (NPS-Cl)、4-ニトロフェニルスルフェニルクロリド (pNPS-Cl)、2,4-ジニトロフェニルスルフェニルクロリド (DNPS-Cl) および2-ニトロ-4-カルボキシフェニルスルフェニルクロリド (NCPS-Cl) などがある (図9)。

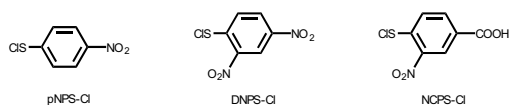
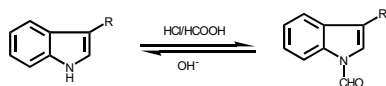


図9 アリールスルフェニルクロリド類

この試薬の欠点は水系にだけでは溶けにくいことであり、酢酸とかギ酸をある割合で使用することが多い。カルボキシル基をもつ NCPS-Cl が比較的溶けやすいので、できるだけ緩和な条件を選ぶときには、この試薬が適用している。しかし、一方では溶媒に有機酸をまったく使用せず、結晶試薬をそのまま用いることもある。

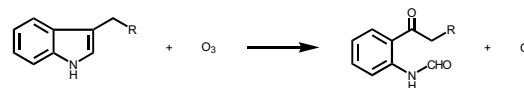
トリプトファンをギ酸に溶かし、塩化水素ガスを通じるとインドールの NH 基がホルミル化を受け、*N*-ホルミルトリプトファンを生成する。*N*-ホルミル基は弱塩基性になると除去され、インドールを再生する。これは、トリプトファンの修飾反応のうちでも唯一の可逆的修飾反応である (Scheme 20)。



Scheme 20

オゾンは気体状の強い酸化剤であり、タンパク質に含まれる殆ど全ての官能基を酸化することができるが、等 mol のオゾンとの反応条件を選ぶと、トリプトファン残基の側鎖インドール核を優先的に酸化して *N*-ホルミルキヌレニン残基に変換することができる⁷⁸。しかし、タ

ンパク質にシステイン残基やメチオニン残基が存在すると、これらの残基の側鎖の硫黄原子も同時に酸化される (Scheme 21)。



Scheme 21

インドール核の酸化反応は殆ど pH の影響を受けず、いろいろの pH でタンパク質のオゾン酸化が可能であるが、トリプトファン残基への選択性を高めるには、酸化に用いるオゾン濃度および反応温度のコントロールが必要である。酸化溶媒として、一般に水、種々の緩衝液や濃厚ギ酸が用いられるが、遊離のアミノ基はオゾンと反応しやすいのでトリス緩衝液は使用しない方がよい。水溶液系の反応では、タンパク質の高次構造を保ったまま修飾できるので、分子表面に存在するトリプトファン残基の修飾に適している⁷⁹。ギ酸系の反応では、タンパク質を変性させた状態で反応させるので、分子内部に存在するトリプトファン残基も修飾される。

フェノール基 (チロシン残基): チロシンはフェノール性水酸基をもち、この水酸基のプロトンの解離は pH 依存的であり、pKa は 10.1 である。プロトンが解離すれば、共鳴によりベンゼン環の電子密度が高くなるので、求電子試薬と反応しやすくなる (図10)。

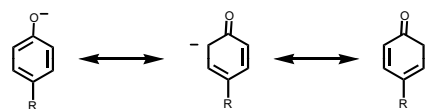
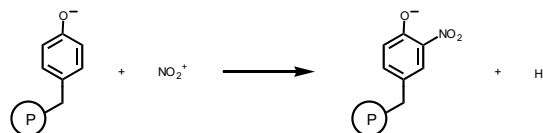


図10 フェノール性水酸基の共鳴構造

チロシンの化学修飾に多用されているテトラニトロメタンとヨウ素化反応について述べる。まず、テトラニトロメタン (TNM) は、Riordan ら⁸⁰および Sokolovsky ら⁸¹が pH8 という穏やかな条件でチロシンおよびタンパク質に作用させ、チロシン水酸基のオルト位にニトロ化が起こり、3-ニトロチロシンが生成することを見出して以来チロシン残基の修飾試薬として用いられるようになった (Scheme 22)。*N*-アセチルイミダゾール⁸²よりも TNM はチロシン残基に対してより選択的である。

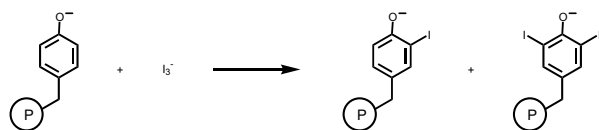


Scheme 22

TNM はチロシンよりチオール基とより速く反応することが知られている⁸³。チオール基のみとの反応では、ニトロホルムイオンに基づく吸収より追跡することがで

きる。反応性は pH5~9の範囲であまり差がないが、pH 5以下では減少する。チオール基と TNM の反応では、ジスルフィドやスルフィン酸が生成する。したがって、チオール基を含むタンパク質でチロシンの修飾を行う場合には、チオール基を可逆的に保護する必要がある。チオール基の保護には四チオン酸カリウム ($S_4O_6^{2-}$) で処理して、S-スルフェニルスルホネート ($R-S-SSO_3^-$) とする。修飾反応後、この保護基はメルカプトエタノールあるいはジチオスレイトールなどのチオール試薬で処理して除去し、チオール基を再生させる⁸⁴。その他のアミノ酸残基との反応として、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジンに大過剰の TNM を使用した場合、pH7 以上でニトロホルムイオンの生成を認め、反応が起こることが報告されている⁸¹。しかし、アミノ酸混合物に TNM を作用させて変化があったのはチロシンとシステインのみであり、反応性には大きな差がある。

ヨウ素化試薬によるチロシン残基の修飾はかなり古くから行われている。ヨウ素化試薬としては、三ヨウ化物イオン (I_3^-)、一塩化ヨウ素、ヨウ化カリウム + クロラミン T などがある。いずれの試薬でも、ヨウ素化の活性種は次亜ヨウ素酸 (HOI) と考えられている。また、ペルオキシダーゼを触媒としてヨウ素化する方法も行われおり、不溶化ラクトペルオキシダーゼを用いる場合もある。チロシンにヨウ素化試薬を作用させると2段階の反応で3-ヨードチロシンと3,5-ジヨードチロシンを与える (Scheme 23)。



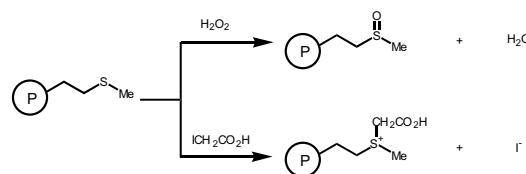
Scheme 23

ヨウ素化反応には¹²⁵I および¹³¹I の放射性ヨウ素を使用することができる便利さあり、標識残基を含むペプチドの分離と反応の課程の比較できる。また、¹²⁵I および¹³¹I は個別に定量することができるので、タンパク質を相当するリガンドを含む系では¹²⁵I 試薬で、リガンドを含まない系では¹³¹I 試薬でヨウ素化を行い、2つのタンパク質を一緒にして、タンパク質分解酵素で消化し、ペプチドを分離する。リガンドが結合する部位にヨウ素化されたチロシンがあると、その残基を含むペプチドでは、¹²⁵I / ¹³¹I の比が他の修飾ペプチドに比べて小さくなる。この方法がカルボキシペプチダーゼ A に p-フェニルプロピオン酸 (拮抗阻害剤) を用いて適用され、Trp248が活性部位に存在することが示された⁸⁵。また、ヨウ素化試薬はチオール基を容易に酸化する。チロシンの選択的修飾を問題とするときは、先に述べたように、チオール基の可逆的な保護が必要である。他のアミノ酸では、ヒ

スチジンがヨウ素化を受け、トリプトファンも酸化反応を受けることがある。

チオエーテル (メチオニン残基) : タンパク質において、メチオニンはその存在率がトリプトファンと同様に低いものであるが、その機能には興味もたれている。チオエーテル基は弱い求核性をもつが、タンパク質中の他の求核的グループとは異なり、pH1~14の範囲でプロトン化することが無いので、酸性条件下での選択的修飾が可能である。

メチオニン残基の修飾には、過酸化水素や過ヨウ素酸などの酸化剤および N-クロロスクシンイミド、N-ブロモスクシンイミド、クロラミン T、トリクロロメタンスルホニルクロリド (CCl_3SO_2Cl) などの活性ハロゲンをもつ酸化剤によるメチオニンスルホキシドへの酸化、ならびにハロゲン化アルキルによるメチオニアルキルスルホニウム塩への変換がある。メチレンブルーを光増感剤とする光酸化反応でも酸性 pH でほぼ選択的にメチオニンスルホキシドへ酸化を受けるが⁸⁶、pH によってはヒスチジンやトリプトファンにも反応を受けるので、光増感酸化反応はそれぞれのタンパク質について反応残基の検討が必要である (Scheme 24)。



Scheme 24

チオールを含まないタンパク質では、過酸化水素はほぼ特異的にメチオニンを酸化し、メチオニンスルホキシドとする。チオール基は過酸化水素によりスルフィン酸やジスルフィドに酸化される。チオールの酸化は低い pH では反応速度が減少するが、メチオニンの酸化は pH が低くなるほど反応性が增大する傾向がある⁸⁷。一般に、他の残基の反応性は pH を低くすると小さくなるので、過酸化水素によるメチオニンの酸化は低 pH 条件下で行われるのが普通である。

次に、Shechter ら⁸⁸は、N-クロロスクシンイミド (NCS)、N-ブロモスクシンイミド (NBS) クロラミン T など活性ハロゲン試薬によるアミノ酸混合物の酸化反応を検討した (図11)。

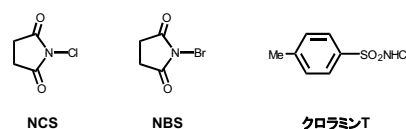
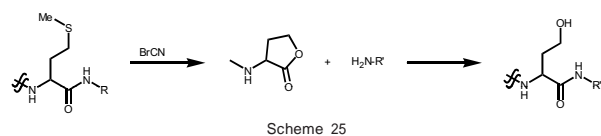


図11 活性化ハロゲン試薬の構造

pH2.2および8.5においてNBS量を増加しつつ酸化生成物を調べた結果、いずれのpHにおいても、メチオニンが最も酸化を受けやすく、ついでトリプトファン、システイン、チロシン、ヒスチジンの順序で変化を受ける。酸性pHの方が、pH8.5よりも酸化反応が起こりやすい。NCSはpH2.2および7.5で、メチオニンおよびトリプトファンのみを酸化する。クロラミンTは、NCSと同様にpH2.2ではメチオニンとトリプトファンの両方を酸化するが、pH8.5ではメチオニンのみを酸化し、トリプトファンには影響を与えない。また、反応性の序列はNB C>NCS>クロラミンTである。

また、メチオニンのチオエーテル基はヨード酢酸やヨードアセトアミドのようなアルキル化試薬と反応してアルキルスルホニウム塩を形成する。pH4以下の酸性領域のアルキル化反応は、メチオニンとシステインに限られ、pHが高くなるとヒスチジンのアミノ基が反応するようになる。

ところで、メチオニン残基に特異的なプロモシアン(BrCN)による化学的開裂は、タンパク質の断片化の最初のステップとして多用され、1次構造を研究する上で欠くことのできない手法になっている⁸⁹。BrCNによりメチオニン残基で開裂したペプチド断片を再結合させる再構成も行われている。BrCNでメチオニン結合を切断した場合にはメチオニン残基はホモセリンラクトンとなり、このホモセリンラクトンが他方のペプチドのアミノ基による求核攻撃を受けて再びペプチド結合を形成すれば、メチオニン残基がホモセリンに置換される(Scheme 25)。このような共有結合の再生がなくても、断片間の非共有結合による相補的な結合により、非修飾タンパク質と同じ空間構造をとり、活性の再生あるいは増大が生じる場合がある。

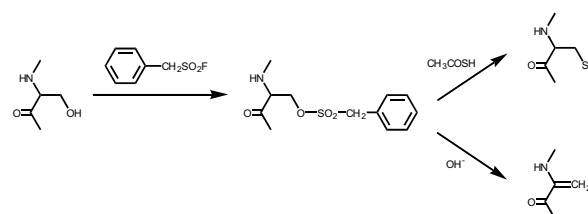


BrCNによる開裂反応は、タンパク質の断片化のみに注目すれば、ペプチド結合の切断を伴わない化学修飾法にはそぐわない。しかし、C末端ホモセリンラクトンにおいて、ペプチド結合の生成が起これば、メチオニン残基のホモセリン残基への変換という1つの修飾反応と考えられる。共有結合形成の有無にかかわらず、BrCN断片間の再結合により活性が再現すれば、各断片に種々の修飾を施すことにより構造と機能の関係を調べることができる。

水酸基 (セリン残基) : 活性部位にセリン残基をもつタンパク質分解酵素には、膵臓からのキモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、十二指腸のエンテロキナー

ゼ、血液凝固系のプロテアーゼ類からパン酵母のカルボキシペプチダーゼY、細菌起源のスプチリシン類までかなりの数のものが知られている。これらは、ジイソプロピルフルオリン酸(DFP)で活性セリン残基がアルキルリン酸化を受けて失活するという共通の性質をもっている。活性部位のセリン残基は大きな求核性水酸基をもつ活性セリンであって、他のセリン残基に比べて反応性が異常に高いことで区別することができる。この活性セリンを含むプロテアーゼ(セリンプロテアーゼ)については、DFPからシアン酸に至るまでさまざまな求電子試薬もよる修飾が行われている⁹⁰。このような特殊なセリンを除けば、他のセリン(およびスレオニン)残基については、緩和な条件下での選択的反応はないに等しい。幾分過酷な条件下のアセチル化反応がある⁹¹。これは、アミノ酸混合物をトリフルオロ酢酸に溶かして塩化アセチルを作用させると、セリン、スレオニンおよびチロシンはOアセチル化を受け、システインはSアセチル化を受け、トリプトファンは分解する。しかし、トリプトファンをギ酸中塩化水素で処理して得られるNホルミルトリプトファンはこの条件で安定である。チロシンのOアセチル基はヒドロキシルアミンによりpH6.5で除去できるが、セリンおよびスレオニンのOアセチル基はpH10以上ではじめて除去することができる。

セリン酵素の活性セリンは特異的な修飾が行えるので、これを利用した2次の修飾反応も可能である(Scheme 26)。



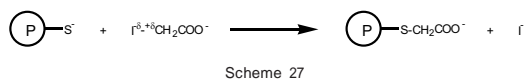
セリンプロテアーゼの活性セリン残基のデヒドロアラニンやシステインへの変換がある。デヒドロアラニン酵素の調整には、フェニルメタンスルホニル酵素をアルカリで処理するが、微妙な条件の設定が必要である。チオール酵素の調整では、フェニルメタンスルホニル酵素をチオ酢酸やチオ安息香酸で処理する。

チオール基 (システイン残基) : システインのチオール基(-SH)とシスチンのジスルフィド基(-S-S-)は、多くの酵素、ホルモン、その他の生物学的に活性なタンパク質の特異的な機能に密接なかわりをもち、したがって多くの生理的過程とも関係がある。チオール基は非常に高い反応性を示し、アルキル化、アシル化、酸化、チオール-ジスルフィド交換反応、フェニルハライドとの反応、メルカプチドの形成、ヘミメルカプタールの形成、

電荷移動型複合体の形成など多種多様の化学反応を起こす。一方、チオール基に比べてジスルフィド結合の反応性は低い。種々の試薬の影響が小さいこと、その安定性から、ジスルフィド結合がタンパク質の高次構造の維持を担っていることが示唆される。

低分子チオール化合物のSH基の場合とは異なり、タンパク質中のSH基のpKaは多くの因子の影響で変化する。その一つは、タンパク質中でのチオール基の空間的配置である。覆われた (masked) あるいは埋没している (buried) チオール基は、タンパク質分子の中の疎水的環境にあって溶媒に接触できないために、一般に分子表面にある (exposed) チオール基よりも高いpKa値を示す。また、タンパク質中のチオール基の電離に影響を与えるもう一つの重要な因子は、近傍に存在する荷電基による静電効果である。チオール基のすぐ近くに荷電したアミノ酸残基が存在すると、チオール基のpKaは~8.35へ低下し、荷電したアミノ酸残基が近傍にないときは、pKaは~9.5となり、また近くに負に荷電したアミノ酸残基があるときにはタンパク質チオール基のpKaは10.3へ上昇する。さらにチオール基は水酸基と異なり、水素結合形成能に乏しい。それは、硫黄に電気陰性度が酸素に比べて小さく、炭素と同等であることから説明することができる。したがって、水素結合の形成によってシステイン残基のチオール基がタンパク質の分子構造の安定化に寄与しているとは考えにくく、-Sは-CH₂-とほぼ等しい疎水性を示すことから非解離状態ではシステインの側鎖はむしろ疎水結合に関与する可能性が高いと考えられている。

チオール基の化学修飾法として、ハロゲン化アルキルによるアルキル化がある (Scheme 27)。ハロゲン化アルキル化剤としては、モノヨード酢酸およびそのアミド、モノブロモ酢酸およびそのアミド、 γ -ヨードプロピオン酸、 γ -プロモエチルアミン、モノクロロ酢酸、クロロアセトフェノンなどが上げられる。



タンパク質チオール基とモノハロ酢酸の反応に関しては、反応試薬のもつカルボキシルアニオン(XCH₂COO⁻; X=I, Br, Cl)とタンパク質あるいは補欠分子族が有する荷電したアミノ酸側鎖との静電相互作用が重要な因子として存在している⁹²。モノハロゲン化酸およびその酸アミド誘導体はチオール基と反応するだけでなく、メチオニンのチオエーテル基と反応してスルホニウム塩を作る。また、イミダゾール基、アミノ基、フェノール基なども反応することが報告されている。種々あるハロ酸の中で γ -ヨードプロピオン酸およびそのアミド化合物

が最もチオール基に対して特異的であり、そのアミドは酸に比べて40倍遅く反応するが、特異性は2倍になる⁹³。

タンパク質中の多数の親核性基は、モノハロ酢酸によってアルキル化され、カルボキシメチル化される。カルボキシメチル化されたタンパク質は通常安定な誘導体であり、修飾タンパク質を研究する場合好都合である。また、チオールは分極したり、あるいは容易に分極可能な二重結合をもつアクリロニトリル、アクリルアミド、アクリル酸エチル、アクロレイン、無水マレイン酸、N-エチルマレイミド、ビニルスルホンなどの化合物に付加する。これらの反応は不可逆で通常塩基性pHで急速におこることから、メルカプチドイオンが反応種である。

その他のアルキル化反応として、キノン環の二重結合に付加してヒドロキシキノンあるいはキノンのチオエーテル誘導体を生成し、またキノンはチオールを酸化してジスルフィドにする。エチレンオキシドによるチオール化合物のS-ヒドロキシエチル化は、メルカプトイオンの求核置換を律速段階として起こり、一般にチオール基のpKaが高ければ高いほど、相当するメルカプチドイオンの反応性が大きくなる。O-メチルイソ尿素は通常タンパク質のアミノ基のグアニジル化に使用されるが、同時にSメチル化も起こる。1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (FDNB)、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) および2,4,6-トリニトロベンゼン-1-スルホン酸 (TNBS) はチオール基をアリル化する。これら3種類の試薬はもともとタンパク質のアミノ基の標識に用いられてきたが、通常、チオール基の方がアミノ基よりも速く反応する。3-マレイミド安息香酸 N-スクシンイミジル (NBS)、エチルクロロアセタミド、4-クロロ-3,5-ジニトロフェナシルプロミドなどは、二官能性試薬として使用されている (図12)。これらは、タンパク質側鎖中、チオール基、アミノ基、イミダゾール基間に架橋する。

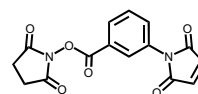
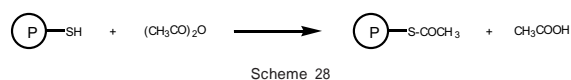


図12 二官能性試薬 NBS の構造

チオール基は、ケテン、塩化アセチル、無水酢酸、無水コハク酸、エチルトリフルオロ酢酸などのアシル化剤と容易に反応する (Scheme 28)。



しかしこの反応はアルキル化反応とは異なり、チオール基に特異的ではなく、アミノ基も容易にアシル化される。

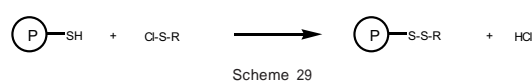
CoA、4-ホスホパンテイン、リボ酸、グルタチオンなどの低分子チオールおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、フィシン、パパイン、チオラーゼなどの酵素に存在する高分子チオール基は、容易にチオエステルを形成してアシル基を転移することができる⁹⁴。このことは、多くの酵素反応において、アシル化酵素の中間段階を経て反応が進行することを証明しており、生物学的に非常に重要である。

低分子チオールやタンパク質チオール基は、ヨウ素、フェリシアニド $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 、四チオン酸ナトリウム $(\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6)$ 、*o*-ヨードソ安息香酸、過酸化水素によって緩和な酸化を受け、分子間あるいは分子内ジスルフィドを形成する。しかし、これらの試薬は、チオール基だけでなく、チロシン、トリプトファン、メチオニンなどの官能基とも容易に反応する。ヨウ素処理では、チロシンのベンゼン環、ヒスチジンのイミダゾール環のヨウ素化が起こる場合もある。チオール基の酸化速度とその性質は、使用する酸化剤とチオール基の酸化還元電位、pH、温度、試薬濃度さらにタンパク質分子構造中の空間配置に依存する。タンパク質中でチオール基どうしの接触が妨げられる場合や、ただ1個しかチオール基を含まない場合には、分子内ジスルフィド結合は形成されない。しかし、特定の条件下では分子間ジスルフィド結合を形成して、その結果タンパク質は凝集する。また、チオール基は酸化剤の添加によって酸化を受けるのはもちろん、空気中の酸素によって自発的に酸化される。この分子状態酸素によるチオール基の酸化速度は、微量の金属イオン(特に、鉄と銅)の存在で非常に加速される。したがって、これら金属イオンと複合体を形成するキレート剤を添加したり、 γ -メルカプトエタノールやジチオトレイトール(DTT)などの添加によって、遊離のチオール基が活性の発現に必要な酵素タンパク質のチオール基の保持、安定化できる。

チオール基の酸化剤中、最も特異的なのはチオール-ジスルフィド交換反応である。このチオール-ジスルフィド交換反応は、多くの生化学的過程に重要な役割を果たしており、タンパク質の再生、またジスルフィド結合を含むタンパク質の生合成の際に、さらにある種のタンパク質の凝固および重合に大きく寄与している。タンパク質の修飾試薬としてのジスルフィド結合は、その反応の可逆性に注目してチオール基の保護に用いられている。例えば、ヘモグロビンのアミノ基をシアネートで修飾するとき、反応性チオール基をシステアミンで保護し⁹⁵、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼをジチオニトロ安息香酸(DTNB)と反応させた後に、求核置換反応でSシアノあるいはSスルホ誘導体を与える⁹⁶。

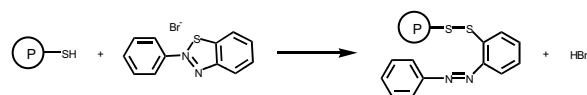
次に、チオール基は酸性溶媒中でハロゲン化スルフェ

ニルと反応し、ジスルフィド結合を生成する (Scheme 29)。



Scheme 29

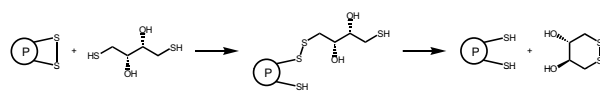
Fontanaらは、この化合物の2-ニトロ、4-ニトロ、2,4-ジニトロフェニル誘導体を合成し、酢酸中でタンパク質と反応させ、システインとトリプトファン残基が選択的に反応することを見出した。ニトロフェニルハロゲン化スルフェニルとシステインの反応生成物は酸性で安定であるが、塩基性で壊れてニトロチオフェノールを放出する。また、 γ -メルカプトエタノール、チオグリコール酸、水素化ホウ素ナトリウムで還元できる。また、アゾベンゼン-2-スルフェニルプロマイドは、先の試薬に比べ、水に易溶で、しかもトリプトファン残基と反応せず、反応をpH5.0で行うことができる (Scheme 30)。



Scheme 30

タンパク質の三次構造の安定化は、弱い非共有結合性相互作用(ファンデルワールス相互作用、水素結合など)を巧みに利用しておこなわれている。しかし、非共有結合性の力はタンパク質の三次構造を安定化する主要な相互作用であるが、これは数ある相互作用の1つにすぎない。多くのタンパク質はさらに共有結合性の相互作用で安定化され、天然状態にある二次構造セグメント間でジスルフィド架橋結合が形成されている。ジスルフィド結合に対して変性剤を共存していない条件下、還元による部分的選択的開裂では、その生物活性がほとんど変わらないか、部分的に無くなっている。これらの修飾タンパク質の安定性は、部分的に還元したタンパク質分子は、たとえばタンパク質分解酵素による消化や熱による変性に対して、未修飾のタンパク質に比較して抵抗性を減じている。また、修飾したタンパク質において、新たに出てきたチオール基を種々の試薬で修飾することによって、タンパク質に構造と機能に関する多くの情報が得られている。

ジスルフィド結合のチオールによる還元的開裂には、過剰のチオールの存在が必要である。 γ -メルカプトエタノール、 γ -メルカプトエチルアミン、DTTあるいはジチオエリストールなどがタンパク質のジスルフィド結合の還元剤として用いられている (Scheme 31)。



Scheme 31

タンパク質中のジスルフィド結合に反応性は、一般に鎖間のジスルフィド結合の方が鎖内ジスルフィド結合よりも還元されやすい。通常タンパク質中の全ジスルフィド結合を切断するためには、尿素、塩酸グアニジン、SDSのような変性剤の共存を必要とする。

その他のジスルフィド結合開裂反応としては、亜硫酸塩あるいは青酸塩を用いた反応⁹⁷、銀イオンおよび水銀イオンによる、アルカリ pH でジスルフィド結合の加水分解反応⁹⁸、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) による還元的開裂反応⁹⁹、モノチオリン酸との反応¹⁰⁰、第三級ホスフィン類による還元¹⁰¹、電解還元¹⁰²、酸化による方法などがある。

化学修飾法を利用したプロテオーム解析¹⁰³⁻¹⁰⁵

ヒト全ゲノム配列が明らかになった今日、タンパク質を理解することの重要性はこれまでになく高まっている。ヒトには数万種類のタンパク質が存在しており、フォールディングして特異的な立体構造を形成し、酵素反応、免疫反応、エネルギー変換、物質輸送、細胞運動など多彩な生命機能を担っている。タンパク質は相互作用して複合体、超分子、さらには複雑なネットワークを形成して、個々のタンパク質では考えられない特異性や高機能性を発揮する。タンパク質を理解するためには、構造と機能を知ることが必要であり、今日のタンパク質研究もこれらの総合的理解を目標として展開している。X線結晶解析や多次元核磁気共鳴法をはじめとするさまざまな手法によってタンパク質の構造が解明され、タンパク質研究の大きな原動力となってきた。しかし、タンパク質の構造はPDBから得られるような美しい立体構造のグラフィックスからイメージされるような静的なものではない。

また、タンパク質は、さまざまな高分子および低分子と相互作用することによって、それぞれ独自の機能を発揮している。あるタンパク質がどの分子を認識するか、あるいはそのタンパク質のどの部分に結合しているかを解析することは、そのタンパク質の機能を研究するうえで重要な知見となる。そのため、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-リガンド相互作用の解析は、タンパク質の機能を明らかにするうえで重要である。近年、タンパク質の相互作用を解析する方法として、表面プラズモン共鳴法、超遠心分析法、マイクロカロリーメトリー法などマクロな分析法や原子レベルでの解析が可能なX線結晶解析、多次元核磁気共鳴法 (NMR) および質量分析法 (MS) などミクロな分析法など多くの優れた方法論が開発されている。ここでは、高感度でかつ迅速な相互作用解析として有用な有機化学的方法とMS

を組み合わせたプロテオーム解析を紹介する。

プロテオーム解析は、ゲノムプロジェクトで見出された遺伝子とタンパク質を対応させたり、それらのタンパク質の機能を明らかにするために、タンパク質の分離精製、アミノ酸配列や立体構造の分析、翻訳後修飾の解析、タンパク質の生理活性の測定などを行う効率的かつ効果的な手法である。一般にプロテオーム解析には、二次元電気泳動などのタンパク質の分離精製法とMSによる高感度アミノ酸配列分析法を組み合わせた超微量タンパク質構造解析法が用いられている。

タンパク質の機能は、様々であるが、機能しているタンパク質はほとんどの場合、何らかの物質と相互作用している。そこで、タンパク質が他のタンパク質あるいはリガンドと相互作用している際の相互作用部位の構造解析、さらに、タンパク質の発現量、発現時期、組織特異性、細胞内での局在性に関する解析を行うために、タンパク質側鎖の官能基への化学修飾を用いたプロテオーム解析の手法が見出された。

アミノ酸残基の存在環境の違いを、側鎖官能基の反応の特異性を利用して質量差に変換する方法が化学修飾である。タンパク質が変性しない条件において化学修飾すると、分子表面に存在する官能基は修飾され質量が増加するのに対し、相互作用に関与する部位に存在する部位に存在する官能基は修飾されず質量変化が起こらない。したがって、この手法はタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-リガンド相互作用部位の解析に利用できる他、タンパク質の表面に存在する残基と分子内部に埋もれている残基との区別にも利用できる。一般的なタンパク質中のアミノ酸残基への化学修飾反応は、前項にまとめたとおりである。親水性のアミノ酸残基の中でもアミノ基、カルボキシル基、チオール基は、種々の特異的な修飾反応が報告されており、修飾による活性の変化を指標として、活性と修飾箇所の関係について解析が数多くなされている。

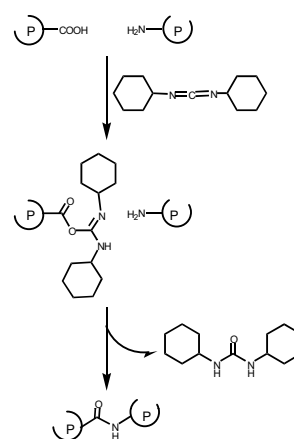
修飾反応後の解析は、まず化学修飾の反応後、得られた修飾タンパク質について、どれだけの質量変化があったのか、MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) -TOF (Time-Of-Flight) MS¹⁰⁶、ESI (Electrospray ionization) MS¹⁰⁷を測定することにより、反応の進行を確認する。タンパク質相互作用部位を解析する際、単独で行った場合と複合体を形成させて行った場合とで、修飾反応後のタンパク質の質量差が見られなかった場合には、反応させる試薬を条件を検討し直す必要がある。反応条件が適切と判断された場合は、修飾タンパク質を酵素消化してペプチド混合物とし、液体クロマトグラフィー (LC) / ESIMS や MALDI-TOFMS によりペプチド断片の質量を測定する。詳しく解析すること

により、複合体形成時には修飾されず、単独で試薬と反応させた場合に修飾された残基が、相互作用にかかわっている部位と特定できる¹⁰⁸。化学修飾反応においてタンパク質の高次構造が保持されていなくてはならないため、円二色性 (CD) スペクトルを測定することにより、修飾反応において二次構造が保持されていることを確認することができる。

化学修飾法によるタンパク質解析として、ミトコンドリアタンパク質の糖化、酸化的ストレスと老化¹⁰⁹、タンパク質アセチル化のモニタリング¹¹⁰、タンパク質翻訳後修正^{111,112}、翻訳後修飾解析へのアプローチ¹¹³、フェニルチオカルバモイルペプチドを用いた反応モニタリングタンデム質量分析¹¹⁴、大腸菌での Ada 依存アルキル化損傷¹¹⁵、アルコール性脂肪肝のプロテオーム分析¹¹⁶、神経科学への適応¹¹⁷、翻訳後修飾のための化学的プロテオミクス¹¹⁸、二次元電気泳動と質量分析との化学的タグアプローチ¹¹⁹、タンパク質糖鎖形成の研究¹²⁰、NO₂基によって引き起こされた修正を伴う血小板タンパク質のプロテオーム解析¹²¹などが報告されている。

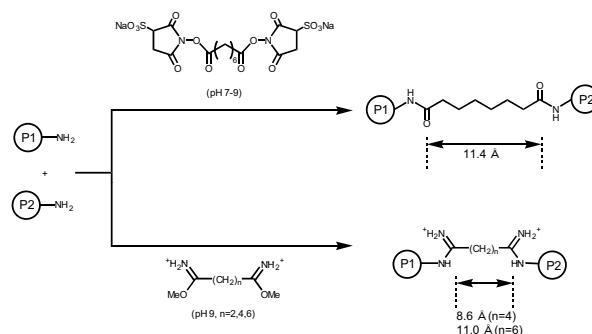
次に、タンパク質の複合体の相対的な位置関係を知るための1つに分子間架橋試薬を用いて化学修飾を行い、MSを利用したペプチドマッピングの手法によりその架橋部位を決定する方法がある。この方法では、緩和な条件下で架橋試薬と反応させることにより、共有結合を介して2つの官能基を固定する。そして、架橋されたタンパク質を酵素消化してペプチド混合物とし、それぞれのペプチドの質量を求めることで架橋部位を決定することができる。架橋方法は、大きく2つに分けられ、1つは、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) のような縮合剤を用いて近接する官能基同士を直接結合する方法である。これは、タンパク質-タンパク質の複合体の場合にも用いられるが、主に1つのタンパク質において分子内架橋を形成させ、近接した官能基の位置を特定する場合に用いられている。2つのチオール基間にジスルフィド結合を形成させたり、アミノ基残基とカルボキシル基残基との間にペプチド結合を形成させたりするのに用いられている。(Scheme 32)。近接して存在する2つの官能基を直接結合するので、本来の官能基の位置よりもさらに近づくことに注意が必要である。

もう1つは、スペーサーを入れて分子間架橋する方法である。これは、2価の架橋試薬を用いて、一定の長さを有するスペーサーを挟んで2つの官能基を固定する方法である。架橋される官能基は、用いる試薬の反応の特異性に依存する。例えば、2つのアミノ基を架橋することもできるが、一方がアミノ基、もう一方がチオール基というように異なる官能基に対しても修飾を行い架橋することもできる。また、架橋試薬の一端にアミノ基に



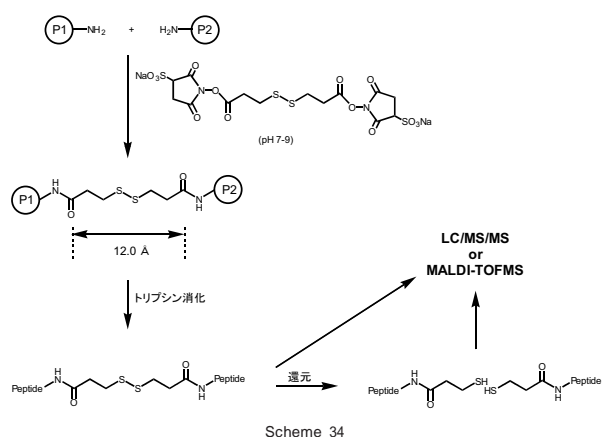
Scheme 32

対しての選択的な修飾試薬を用い反応させた後、もう一端をアジドのように光アフィニティラベル化試薬にして非特異的な修飾反応を行うことも可能である。これにより、第一段階の反応で修飾されたアミノ基近傍に存在するアミノ酸残基を非特異的な反応で架橋することができる (Scheme 33)。

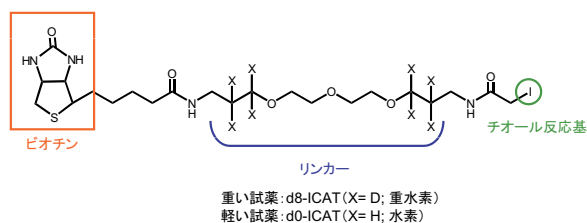


Scheme 33

架橋試薬の中には、化学的に切断可能なスペーサーをもつものもある。これは、2つのアミノ酸の架橋試薬で分子内にジスルフィド結合をもつ水溶性試薬3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジルスルホナート) (DTSSP) の反応がある¹²²。DTSSPでは12.0のスペーサーを挟んで2つのアミノ酸を架橋することができる。架橋反応後、キモトリプシンを不活性化したTPCK処理トリプシン消化を行い、ペプチド混合物とした後、還元剤により切断する。架橋後のトリプシン消化で得られたペプチド混合物と消化後に還元して得られたペプチド混合物のMSスペクトルを比較することにより、架橋試薬により修飾されたペプチドを比較的容易に見つけ出すことができる。また、架橋されたペプチドのMS/MS測定を行う場合、繋がれた2本のペプチド鎖のフラグメントイオンが1つ観測されるのでその解析は容易ではないが、還元により切り離した場合には、MS/MS測定では1本のペプチド鎖のフラグメントイオンだけを観測できるので、配列解析を容易に行うことができる利点がある (Scheme 34)。



さらに、同位体標識試薬を用いたタンパク質の発現解析がある。生体内ではそれぞれの遺伝子の発現量は生体の状況によって変動するので、網羅的にタンパク質の量を調べる必要である。しかし、タンパク質はその抽出法が画一でなく、翻訳後修飾を受けるなど取り扱いが難しく網羅的な変動を調べることは困難であった。1999年に Oda¹²³ と Gyi¹²⁴ らによって MS を用いて異なる状態のタンパク質の存在量の違いを定量的に測定する方法が報告された。これは、異なる状態の細胞のタンパク質を安定同位体で標識し、MS による分析でえられるペプチドマスマフィンガープリントと比較することでタンパク質の量的な差を解明しようとするものである。この方法は、タンパク質の絶対量を正確に捉えることは難しいが、異なる組織細胞のタンパク質存在量の相対的な違いを精度よく検出することができる。具体的には、異なる組織から抽出したタンパク質のシステイン残基に異種の同位体を結合させたビオチン (Isotope-coded Affinity Tag ; ICAT) を共有結合させた両組織のタンパク質を混合し、そのまま酵素消化してアビジン固定化カラムによりビオチン化されたペプチドを分離し、これを LC/MS/MS を用いて分析し、量的変化のあるタンパク質を検出する方法である (図13)。



ICAT 試薬を用いる事により、システイン残基を含むペプチドのみ検出できるため MS スペクトルが単純になり解析が容易になる一方、この方法ではシステインを持たないタンパク質を検出できないという欠点もある。

また、ICAT のビオチン骨格はイオン化しやすく、その他のペプチドのピークが検出されにくく、タンパク質の同定効率が下がる問題がある。そこで、ビオチンタグを除去できる cleavable ICATTM 試薬が開発された^{125,126}。これは、ビオチンタグの隣に酸で切断する部位があり、アビジンカラムを通した後、トリフルオロ酢酸で切断し、ビオチンタグを除去する。さらに、リンカー部位が重水素から¹³C に変わり、8Da の差から9Da に変えられた (図14)。

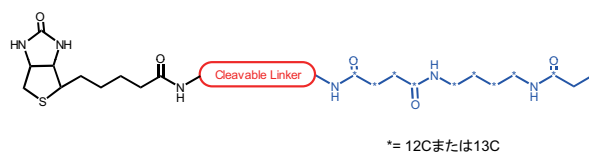


図14 cleavable ICAT 試薬の構造

その他、システイン残基へのラベル化試薬として、アクリルアミド (31)¹²⁷⁻¹²⁹、4-ビニルピリジン (32)¹³⁰、ヨードアセトアニリド (33)¹³¹ などがある (図15)。

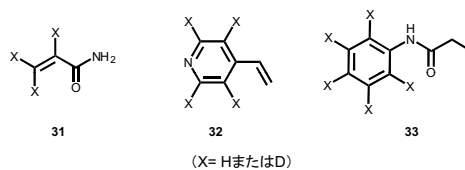


図15 チオール基反応性安定同位体標識試薬

その他の安定同位体標識試薬としては、リシン残基の -アミノ基を特異的に修飾する O-メチルイソ尿素 (34)^{132,133}、-アミノ基およびリシン残基の -アミノ基を化学修飾するコハク酸無水物 (35)¹³⁴、プロピオン酸無水物 (36)^{135,136}、ICPLTM 試薬 (37)^{137,138}、Exac TagTM 試薬¹³⁹、SPITCTM 試薬 (38)^{140,141} および iTARQTM 試薬 (39)¹⁴²⁻¹⁴⁴ などがある。また、トリプトファン残基のインドール基に反応する NBSTM 試薬 (40)^{75,76,145} がある (図16)。

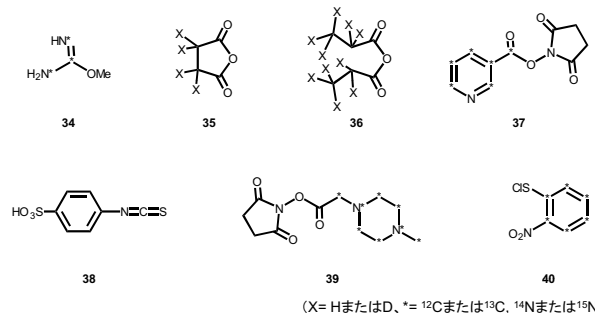


図16 アミノ基およびインドール基反応性安定同位体標識試薬

また、翻訳後修飾タンパク質であるリン酸化セリン・スレオニンに対して塩基性条件下でベータ脱離反応を起こし、デヒドロアラニン骨格とし、1,2-エタンジオール (HSCX₂CX₂SH) などのチオール誘導体を作用させマイケル付加反応を起こすことにより、安定同位体を標識させる方法もある¹⁴⁶。

将来への展望

以上、タンパク質中のアミノ酸残基の化学修飾法から化学修飾法を利用したプロテオーム解析の現状について述べた。タンパク質は生命体の主要な機能分子であり、栄養学においても体タンパク質代謝は、タンパク質摂取量やエネルギー摂取量により、また成長、加齢、妊娠、授乳、運動など生理的状態や、ストレス、低栄養、疾病、外傷などの病的状態において適応的に変化しており、その根源はタンパク質の構造と機能からきている。

タンパク質中のアミノ酸残基への化学修飾は、古くから研究がなされているが、修飾反応の条件においてタンパク質の高次構造が変化しないことが重要であり、そのためには比較的緩和な条件下、かつ、非特異的な会合が起こらない条件下で行われなければならない。この様なことから修飾反応の特性や様式を一般化して、すべてのタンパク質に適用することは容易なことではない。

また、ポストゲノム世代におけるプロテオーム解析として、タンパク質 - タンパク質相互作用、タンパク質 - リガンド相互作用の同定解析から発現解析あるいはリン酸化部位、糖結合部位のような翻訳後修飾解析について定量的情報を得る定量解析へとシフトしてきている。このため、従来のタンパク質を網羅的に同定し、その機能を解明することを目的としていた方法では、限界があり新たな解析方法として化学修飾法を用いたプロテオーム解析法の必要性が問われている。しかしながら、プロテオーム解析に利用されている化学修飾法は、チオール基、インドール基、アミノ基の3種類に限られており、これらの残基同様にタンパク質表面に存在する傾向が大きい親水性アミノ酸のセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンなどの側鎖を選択的に修飾する方法は報告されておらず、また疎水性アミノ酸についても特異的な修飾方法は報告されていない。

このように、化学修飾法によるタンパク質解析法はまだ発展途上段階にあり、目的のタンパク質解析に応じた新たな試薬・方法論が開発される今後の発展に期待したい。

最後に我々は、化学修飾を利用したタンパク質解析の向上を目的とし、タンパク質中のジスルフィド結合に特化した反応基とスペーサーを巧みに組み合わせた架橋試

薬の改良により、定性と定量の同時解析を行える可能性が高い修飾化試薬の開発に取り組む予定である。

参考文献

1. Horwich, A. L. & Weissman, J. S. Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. *Cell* 89, 499-510 (1997).
2. Booth, D. R. et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385, 787-93 (1997).
3. Sidransky, D. & Hollstein, M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 47, 285-301 (1996).
4. Fersht, A. タンパク質の構造と機構. 医学出版 (2006).
5. David W. Mount, 岡崎 康司 / 坊農 秀雅 (監訳). *バイオインフォマティクス ゲノム配列から機能解析へ*. メディカル・サイエンス・インターナショナル (2002).
6. Petsko A Gregory, Ringe, D. タンパク質の構造と機能 ゲノム時代のアプローチ. *メディカル・サイエンス・インターナショナル* (2005).
7. 大野素徳. 生物化学実験法 12. 学会出版センター (1981).
8. 大野素徳. 生物化学実験法 13. 学会出版センター (1981).
9. 石黒正恒. 生物化学実験法 8. 学会出版センター (1978).
10. Means, G. E. & Feeney, R. E. Reductive alkylation of amino groups in proteins. *Biochemistry* 7, 2192-201 (1968).
11. Stark, G. [The excretion of aldosterone, cortisone and cortisol in non-pregnant subjects and in normal and pathological pregnancy.]. *Arch Gynakol* 192, 519-30 (1960).
12. Stark, G. R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* 4, 1030-6 (1965).
13. Boyd, H., Calder, I. C., Leach, S. J. & Milligan, B. N-acylsuccinimides as acylating agents for proteins: synthesis, hydrolysis and aminolysis. *Int J Pept Protein Res* 4, 109-15 (1972).
14. Habeeb, A. F., Cassidy, H. G. & Singer, S. J. Molecular structural effects produced in proteins by reaction with succinic anhydride. *Biochim Biophys Acta* 29, 587-93 (1958).
15. Frist, R. H., Bendet, I. J., Smith, K. M. & Lauffer, M. A. The protein subunit of cucumber virus 4; degradation of viruses by succinylation. *Virology* 26, 558-66 (1965).
16. Gounaris, A. D. & Perlmann, G. E. Succinylation of pepsinogen. *J Biol Chem* 242, 2739-45 (1967).
17. Habeeb, A. F. & Atassi, M. Z. Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. IV. Demonstration of conformational differences between alpha-lactalbumin and lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 236, 131-41 (1971).
18. Shiao, D. D., Lumry, R. & Rajender, S. Modification of protein properties by change in charge. Succinylated chymotrypsinogen. *Eur J Biochem* 29, 377-85 (1972).
19. Maeda, H. Chemical and biological characterization of succinyl neocarzinostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 27, 303-11

- (1974).
20. Butler, P. J., Harris, J. I., Hartley, B. S. & Leberman, R. The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. *Biochem J* 112, 679-89 (1969).
 21. Marzotto, A. Comparative acetoacetylation of proteins. *Experientia* 25, 1016-7 (1969).
 22. Tamaoki, H., Murase, Y., Minato, S. & Nakanishi, K. Reversible chemical modification of protein by 2-methoxy-5-nitropropone. Renaturation of nitropropionyl taka-amylase. *J Biochem* 62, 7-14 (1967).
 23. Tamaoki, H., Sakiyama, F. & Narita, K. Preparation and properties of trypsin-digested ribonuclease T1 split at the single arginyl peptide bond. *J Biochem* 79, 579-89 (1976).
 24. Scrimger, S. T. & Hofmann, T. The involvement of the amino-terminal amino acid in the activity of pancreatic proteases. II. The effects of nitrous acid on trypsin. *J Biol Chem* 242, 2528-33 (1967).
 25. Wasi, S. & Hofmann, T. A pH-dependent conformational change in porcine elastase. *Biochem J* 106, 926-7 (1968).
 26. Dixon, J. W. & Hofmann, T. The reaction with nitrous acid of the "active site" N-terminal isoleucine in chymotrypsin and derivatives. *Can J Biochem* 48, 671-81 (1970).
 27. Hofmann, T. Amino-terminal groups in zymogen activation: effect of nitrous acid on pepsin. *Can J Biochem* 47, 1099-101 (1969).
 28. Kumagai, K., Maeda, H. & Ishida, N. Biological activity of neocarzinostatin and its derivatives. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 6, 546-50 (1966).
 29. Levy, D. & Carpenter, F. H. Insulin methyl ester. Specific cleavage of a peptide chain resulting from a nitrogen to oxygen acyl shift at a threonine residue. *Biochemistry* 9, 3215-22 (1970).
 30. Khorana, H. G. The chemistry of carbodiimides. *Chem. Rev.* 53, 145-166 (1953).
 31. Hoare, D. G., and D. E. Koshland, Jr. A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 2057-2058 (1966).
 32. Carraway, K. L. & Triplett, R. B. Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups. *Biochim Biophys Acta* 200, 564-6 (1970).
 33. Perfetti, R. B., Anderson, C. D. & Hall, P. L. The chemical modification of papain with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Biochemistry* 15, 1735-43 (1976).
 34. Bodlaender, P., Feinstein, G. & Shaw, E. The use of isoxazolium salts for carboxyl group modification in proteins. Trypsin. *Biochemistry* 8, 4941-9 (1969).
 35. Wilcox, P. E. Determination of amide residues by chemical methods. *Methods in enzymology* vol. 11, 63-76 (1967).
 36. Riehm, J. P. & Scheraga, H. A. Structural Studies Of Ribonuclease. XVII. A Reactive Carboxyl Group In Ribonuclease. *Biochemistry* 4, 772-82 (1965).
 37. Grossberg, A. L., and D. Pressman. Nature of the combining site of antibody against a hapten bearing a positive charge. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 5478-5482 (1960).
 38. Booth, H. S., and Martin, D.R. Boron Trifluoride and Its Derivatives. John Wiley, New York (1949).
 39. Nakayama, H., Tanizawa, K. & Kanaoka, Y. Modification of carboxyl groups in the binding sites of trypsin with the Meerwein reagent. *Biochem Biophys Res Commun* 40, 537-41 (1970).
 40. Paterson, A. K. & Knowles, J. R. The number of catalytically essential carboxyl groups in pepsin. Modification of the enzyme by trimethylxonium fluoroborate. *Eur J Biochem* 31, 510-7 (1972).
 41. Atassi, M. Z. & Rosenthal, A. F. Specific reduction of carboxyl groups in peptides and proteins by diborane. *Biochem J* 111, 593-601 (1969).
 42. Zytkovicz, T. H. & Nelsestuen, G. L. [3H]diborane reduction of vitamin K-dependent calcium-binding proteins. Identification of a unique amino acid. *J Biol Chem* 250, 2968-72 (1975).
 43. Takahashi, S. & Cohen, L. A. The reductive conversion of N-terminal pyroglutamyl into prolyl residues in polypeptides and proteins. *Biochemistry* 8, 864-70 (1969).
 44. Takahashi, K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J Biol Chem* 243, 6171-9 (1968).
 45. Takahashi, K. Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *J Biochem* 81, 403-14 (1977).
 46. Borders, C. L., Jr. & Riordan, J. F. An essential arginyl residue at the nucleotide binding site of creatine kinase. *Biochemistry* 14, 4699-704 (1975).
 47. Weng, L., Heinrikson, R. L. & Westley, J. Active site cysteinyl and arginyl residues of rhodanese. A novel formation of disulfide bonds in the active site promoted by phenylglyoxal. *J Biol Chem* 253, 8109-19 (1978).
 48. Toi, K., Bynum, E., Norris, E. & Itano, H. A. Studies on the chemical modification of arginine. I. The reaction of 1,2-cyclohexanedione with arginine and arginyl residues of proteins. *J Biol Chem* 242, 1036-43 (1967).
 49. Patthy, L. & Smith, E. L. Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme. *J Biol Chem* 250, 565-9 (1975).
 50. Patthy, L. & Smith, E. L. Reversible modification of arginine residues. Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues. *J Biol Chem* 250, 557-64 (1975).
 51. Yankeelov, J. A., Jr., Mitchell, C. D. & Crawford, T. H. A simple trimerization of 2,3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins. *J Am Chem Soc* 90, 1664-6 (1968).
 52. Yankeelov, J. A., Jr. Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. *Biochemistry* 9, 2433-9 (1970).
 53. Riordan, J. F. Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione.

- Biochemistry 12, 3915-23 (1973).
54. Schneider, F. Histidine in enzyme active centers. *Angew Chem Int Ed Engl* 17, 583-92 (1978).
 55. Melchior, W. B., Jr. & Fahrney, D. Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with alpha-chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4. *Biochemistry* 9, 251-8 (1970).
 56. Wells, M. A. Effects of chemical modification on the activity of *Crotalus adamanteus* Phospholipase A 2. Evidence for an essential amino group. *Biochemistry* 12, 1086-93 (1973).
 57. Rosen, C. G., Gejvall, T. & Andersson, L. O. Reaction of diethyl pyrocarbonate with indole derivatives with special reference to the reaction with tryptophan residues in a protein. *Biochim Biophys Acta* 221, 207-13 (1970).
 58. Muhlrads, A., Hegyi, G. and Toth, G. Effect of diethylpyrocarbonate on proteins. *Acta Biochim. Biophys.* 2, 19-29 (1967).
 59. Weil, L., Seibles, T. S. & Herskovits, T. T. Photooxidation of bovine insulin sensitized by methylene blue. *Arch Biochem Biophys* 111, 308-20 (1965).
 60. Westhead, E. W. Photo-oxidation with rose bengal of a critical histidine residue in yeast enolase. *Biochemistry* 4, 2139-2144 (1965).
 61. Francis, S. H., Meriwether, B. P. & Park, J. H. Effects of photooxidation of histidine-38 on the acetylphosphatase activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 12, 355-9 (1973).
 62. Lowe, G. & Whitworth, A. S. A kinetic and fluorimetric investigation of papain modified at tryptophan-69 and -177 by N-bromosuccinimide. *Biochem J* 141, 503-15 (1974).
 63. Keil-Dlouha, V. & Keil, B. Consequences of the modification of tryptophan-215 on the function of bovine alpha-chymotrypsin. *J Mol Biol* 81, 381-94 (1973).
 64. Hayashi, K., Imoto, T., Funatsu, G. & Funatsu, M. The position of the active tryptophan residue in lysozyme. *J Biochem* 58, 227-35 (1965).
 65. van den Bergh, C. J., Bekkers, A. C., Verheij, H. M. & de Haas, G. H. Glutamic acid 71 and aspartic acid 66 control the binding of the second calcium ion in porcine pancreatic phospholipase A2. *Eur J Biochem* 182, 307-13 (1989).
 66. Patchornik, A., W. B. Lawson, and B. Witkop. Selective cleavage of peptide bonds. II. The tryptophyl peptide bond and the cleavage of glucagon. *J Am Chem Soc.* 80, 4747-4748 (1958).
 67. Patchornik, A. L., William B.; Gross, Erhard; Witkop, B. The use of N-bromosuccinimide and N-bromoacetamide for the selective cleavage of C-tryptophyl peptide bonds in model peptides and glucagon. *J Am Chem Soc.* 82, 5923-5927 (1960).
 68. Spande, T. F., Green, N. M. & Witkop, B. The reactivity toward N-bromosuccinimide of tryptophan in enzymes, zymogens, and inhibited enzymes. *Biochemistry* 5, 1926-33 (1966).
 69. Ohno, M., Spande, T. F. & Witkop, B. Cyclization of tryptophan and tryptamine derivatives to pyrrolo[2,3-b]indoles. *J Am Chem Soc* 90, 6521-2 (1968).
 70. Funatsu, M., N. M. Green, and B. Witkop. Differential Oxidation of Protein-Bound Tryptophan and Tyrosine by N-Bromosuccinimide in Urea Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1846-1848 (1864).
 71. Johnson, W. D. K. a. C. R. Oxidation of sulphides to sulphoxides with 1-chlorobenzotriazole. *Chem. Commun.*, 365 (1969).
 72. Omenn, G. S., Fontana, A. & Anfinsen, C. B. Modification of the single tryptophan residue of staphylococcal nuclease by a new mild oxidizing agent. *J Biol Chem* 245, 1895-902 (1970).
 73. Horton, H. R. & Koshland, D. E., Jr. A Highly Reactive Colored Reagent With Selectivity For The Tryptophan Residue In Proteins. 2-Hydroxy-5-Nitrobenzyl Bromide. *J Am Chem Soc* 87, 1126-32 (1965).
 74. Horton, H. R. a. K., D. E., Jr. Modification of proteins with active benzyl halides. *Meth. Enzymol.* 25, 468-482 (1972).
 75. Scoffone, E., Fontana, A. & Rocchi, R. Selective modification of the tryptophan residue in peptides and proteins using sulfenyl halides. *Biochem Biophys Res Commun* 25, 170-4 (1966).
 76. Scoffone, E., Fontana, A. & Rocchi, R. Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. I. Modification of tryptophan residues. *Biochemistry* 7, 971-9 (1968).
 77. Fontana, A., Scoffone, E. & Benassi, C. A. Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. II. Modification of cysteinyl residues. *Biochemistry* 7, 980-6 (1968).
 78. Tamaoki, H., Sakiyama, F. & Narita, K. Chemical modification of ribonuclease T1 with ozone. *J Biochem* 83, 771-81 (1978).
 79. Kuroda, M., Sakiyama, F. & Narita, K. Oxidation of tryptophan in lysozyme by ozone in aqueous solution. *J Biochem* 78, 641-51 (1975).
 80. J.F. Riordan, M. S., and B. L. Vallee. Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4104-4105 (1966).
 81. Sokolovsky, M., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry* 5, 3582-9 (1966).
 82. Riordan, J. F., Wacker, W.E.C., and Vallee, B.L. N Acetylimidazole: A reagent for determination of free" tyrosyl residues of proteins. *Biochemistry* 4, 1758-1765 (1965).
 83. Riordan, J. F. & Christen, P. Reaction of tetranitromethane with protein sulfhydryl groups. Inactivation of aldolase. *Biochemistry* 7, 1525-30 (1968).
 84. Parker, D. J. & Allison, W. S. The mechanism of inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by tetrathionate, o-iodosobenzoate, and iodine monochloride. *J*

- Biol Chem 244, 180-9 (1969).
85. Roholt, O. A. & Pressman, D. The sequence around the active-center tyrosyl residue of bovine pancreatic carboxypeptidase A. Proc Natl Acad Sci U S A 58, 280-5 (1967).
 86. Schachter, H. & Dixon, G. H. Preferential Oxidation Of The Methionine Residue Near The Active Site Of Chymotrypsin. J Biol Chem 239, 813-29 (1964).
 87. Toennies, G., and T. P. Callan. Methionine studies. III. A comparison of oxidative reactions of methionine, cysteine and cystine. Determination of methionine by hydrogen peroxide oxidation. J. Biol. Chem. 129, 481-490 (1939).
 88. Shechter, Y., Burstein, Y. & Patchornik, A. Selective oxidation of methionine residues in proteins. Biochemistry 14, 4497-503 (1975).
 89. Witkop, E. G. a. B. Selective cleavage of the methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. J. Am. chem. Soc. 83, 1510-1511 (1961).
 90. Jansen, E. F., Nutting, F. & et al. Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate; crystallization of inhibited chymotrypsin. J Biol Chem 179, 189-99 (1949).
 91. Previero, A., Barry, L. G. & Coletti-Previero, M. A. Specific O-acylation of hydroxylamino acids in presence of free amino groups. Biochim Biophys Acta 263, 7-13 (1972).
 92. Evans, N. & Rabin, B. R. Inhibition studies on liver alcohol dehydrogenase. Eur J Biochem 4, 548-54 (1968).
 93. Wallenfels, K. & Eisele, B. Stereospecific alkylation with asymmetric reagents. Eur J Biochem 3, 267-75 (1968).
 94. Lynen, F. Functional thiol groups in enzymic catalysis. Biochem J 117, 47P-48P (1970).
 95. Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L. The binding of carbon dioxide by horse haemoglobin. Biochem J 124, 31-45 (1971).
 96. Vanaman, T. C. & Stark, G. R. A study of the sulfhydryl groups of the catalytic subunit of Escherichia coli aspartate transcarbamylase. The use of enzyme-5-thio-2-nitrobenzoate mixed disulfides as intermediates in modifying enzyme sulfhydryl groups. J Biol Chem 245, 3565-73 (1970).
 97. Cecil, R. & Loening, U. E. The reaction of the disulphide groups of insulin with sodium sulphite. Biochem J 76, 146-55 (1960).
 98. Cecil, R. & Mc, P. J. The sulfur chemistry of proteins. Adv Protein Chem 14, 255-389 (1959).
 99. Lawrence, F. K. a. M. L. S. The Basic Trypsin Inhibitor of Bovine Pancreas: VII. REDUCTION WITH BOROHYDRIDE OF DISULFIDE BOND LINKING HALF-CYSTINE RESIDUES 14 AND 38. J. Biol. Chem. 242, 4925-4929 (1967).
 100. Neumann, H., Steinberg, I. Z., Brown, J. R., Goldberger, R. F. & Sela, M. On the non-essentiality of two specific disulphide bonds in ribonuclease for its biological activity. Eur J Biochem 3, 171-82 (1967).
 101. Humphrey, R. E. P., J. L. Reduction of disulfides with tributylphosphine. Anal. Chem. 37, 164-165 (1965).
 102. Berezin, I. V., Kazanskaia, N. F., Khludova, M. S. & Khusainova, R. B. Electroreduction of S-S-linkages in alpha-chymotrypsin. Biokhimiia 33, 644-51 (1968).
 103. 丹羽利充. ポストゲノム・マススペクトロメトリー. 化学同人 (2003).
 104. 平野久. プロテオーム解析. 東京化学同人 (2001).
 105. 原田健一. 生命科学のための最新マススペクトロメトリー. 講談社 (2002).
 106. Tanaka, K., Ido Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida T. Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer IV - Generation of Quasi-Molecular Ions from High Mass Organic Compound. 35-kai Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai, Yoshishu 23, 22-23 (1987).
 107. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246, 64-71 (1989).
 108. Akashi, S. et al. Characterization of the structural difference between active and inactive forms of the Ras protein by chemical modification followed by mass spectrometric peptide mapping. Anal Biochem 248, 15-25 (1997).
 109. Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Portero-Otin, M. & Pamplona, R. [Glycation of mitochondrial proteins, oxidative stress and aging.]. Rev Esp Geriatr Gerontol.
 110. Yang, Y. Y., Ascano, J. M. & Hang, H. C. Bioorthogonal chemical reporters for monitoring protein acetylation. J Am Chem Soc 132, 3640-1.
 111. Heal, W. P. & Tate, E. W. Getting a chemical handle on protein post-translational modification. Org Biomol Chem 8, 731-8.
 112. Rudolph, T. K. & Freeman, B. A. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. Sci Signal 2, re7 (2009).
 113. Baliban, R. C. et al. A novel approach for untargeted post-translational modification identification using integer linear optimization and tandem mass spectrometry. Mol Cell Proteomics.
 114. Diego, P. A. et al. Site-preferential dissociation of peptides with active chemical modification for improving fragment ion detection. Anal Chem 82, 23-7.
 115. Baek, J. H., Han, M. J., Lee, S. Y. & Yoo, J. S. Transcriptome and proteome analyses of adaptive responses to methyl methanesulfonate in Escherichia coli K-12 and ada mutant strains. BMC Microbiol 9, 186 (2009).
 116. Newton, B. W., Russell, W. K., Russell, D. H., Ramaiah, S. K. & Jayaraman, A. Liver proteome analysis in a rodent model of alcoholic steatosis. J Proteome Res 8, 1663-71 (2009).
 117. Liao, L., McClatchy, D. B. & Yates, J. R. Shotgun proteomics in neuroscience. Neuron 63, 12-26 (2009).
 118. Tate, E. W. Recent advances in chemical proteomics: exploring the post-translational proteome. J Chem Biol 1, 17-

- 26 (2008).
119. Leitner, A. & Lindner, W. Applications of chemical tagging approaches in combination with 2DE and mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 519, 83-101 (2009).
 120. Chen, R. et al. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res* 8, 651-61 (2009).
 121. Hoffman, M. D., Walsh, G. M., Rogalski, J. C. & Kast, J. Identification of nitroxyl-induced modifications in human platelet proteins using a novel mass spectrometric detection method. *Mol Cell Proteomics* 8, 887-903 (2009).
 122. Bennett, K. L. et al. Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping—a novel approach to assess intermolecular protein contacts. *Protein Sci* 9, 1503-18 (2000).
 123. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. & Chait, B. T. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6591-6 (1999).
 124. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B.R., and Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720-1730 (1999).
 125. Hansen, K. C. et al. Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol Cell Proteomics* 2, 299-314 (2003).
 126. Li, J., Steen, H. & Gygi, S. P. Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol Cell Proteomics* 2, 1198-204 (2003).
 127. Sechi, S. & Chait, B. T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem* 70, 5150-8 (1998).
 128. Sechi, S. A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 1416-24 (2002).
 129. Faca, V. et al. Quantitative analysis of acrylamide labeled serum proteins by LC-MS/MS. *J Proteome Res* 5, 2009-18 (2006).
 130. Sebastiano, R., Citterio, A., Lapadula, M. & Righetti, P. G. A new deuterated alkylating agent for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 2380-6 (2003).
 131. Pasquarello, C., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F. & Corthals, G. L. N-t-butyliodoacetamide and iodoacetanilide: two new cysteine alkylating reagents for relative quantitation of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 117-27 (2004).
 132. Brancia, F. L., Montgomery, H., Tanaka, K. & Kumashiro, S. Guanidino labeling derivatization strategy for global characterization of peptide mixtures by liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 2748-55 (2004).
 133. Warwood, S. et al. Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20, 3245-56 (2006).
 134. Wang, S. & Regnier, F. E. Proteomics based on selecting and quantifying cysteine containing peptides by covalent chromatography. *J Chromatogr A* 924, 345-57 (2001).
 135. Nam, H. W., Simpson, R. & Kim, Y. S. N-terminal isotope tagging with propionic anhydride: proteomic analysis of myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826, 91-107 (2005).
 136. Zhang, X., Jin, Q. K., Carr, S. A. & Annan, R. S. N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 2325-32 (2002).
 137. Munchbach, M., Quadroni, M., Miotto, G. & James, P. Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal Chem* 72, 4047-57 (2000).
 138. Schmidt, A., Kellermann, J. & Lottspeich, F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5, 4-15 (2005).
 139. Michael D. Powell, G. M., Lee Spate, Miriam Sutovsky, Shawn Zimmerman, Shrikesh C. Sachdev, Mark Hannink, Randall S. Prather, Peter Sutovsky. Discovery of putative oocyte quality markers by comparative ExacTag proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 4, 337-351 (2010).
 140. Wang, D., Kalb, S. R. & Cotter, R. J. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 96-102 (2004).
 141. Zhang, X., Rogowska-Wrzesinska, A. & Roepstorff, P. On-target sample preparation of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides using AnchorChip Targets. *J Mass Spectrom* 43, 346-59 (2008).
 142. Aggarwal, K., Choe, L. H. & Lee, K. H. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 112-20 (2006).
 143. Leitner, A. & Lindner, W. Chemistry meets proteomics: the use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics. *Proteomics* 6, 5418-34 (2006).
 144. Ross, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-69 (2004).
 145. Matsuo, E., Watanabe, M., Kuyama, H. & Nishimura, O. A new strategy for protein biomarker discovery utilizing 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) reagent and its applications to clinical samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 2607-14 (2009).
 146. Goshe, B. M., Conrads, T.P., Panisko, E.A., Angell, N.H., Veenstra, T.D. and Smith, R.D. Phosphoprotein isotope-

coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. *Anal. Chem.* 73, 2578-2586 (2001).