

Q. タンパク質以外の液中のカルボン酸との反応は進行するのか？（以下の質問の中で答えています。）

Q. **tetrazole** 構造を色々な分子に組み込んでいると思うのですが、その際の構造(例えば、カルボン酸との初期検討では芳香環に挟まれた構造でしたが、他の分子では異なっているようです)はどのように設計されているのでしょうか？合成のしやすさなどでしょうか？

**A. 反応性を比較した実験はありますが、設計上の理由についての言及はなかったです。**

**液中の他のカルボン酸との反応は低そうだと考えられます（本文記載はなし）**

詳しくは説明していませんでしたが、構造は後半の検討では異なっています。研究者の異なる論文で、同時期に発表されたということもあり、本文中での言及はほとんどなかったです。“ほとんど”と言ったのは、**diaryltetrazole** と、**2-aryl-5-carboxytetrazole** で反応性を比較した実験がありました<sup>1</sup>。

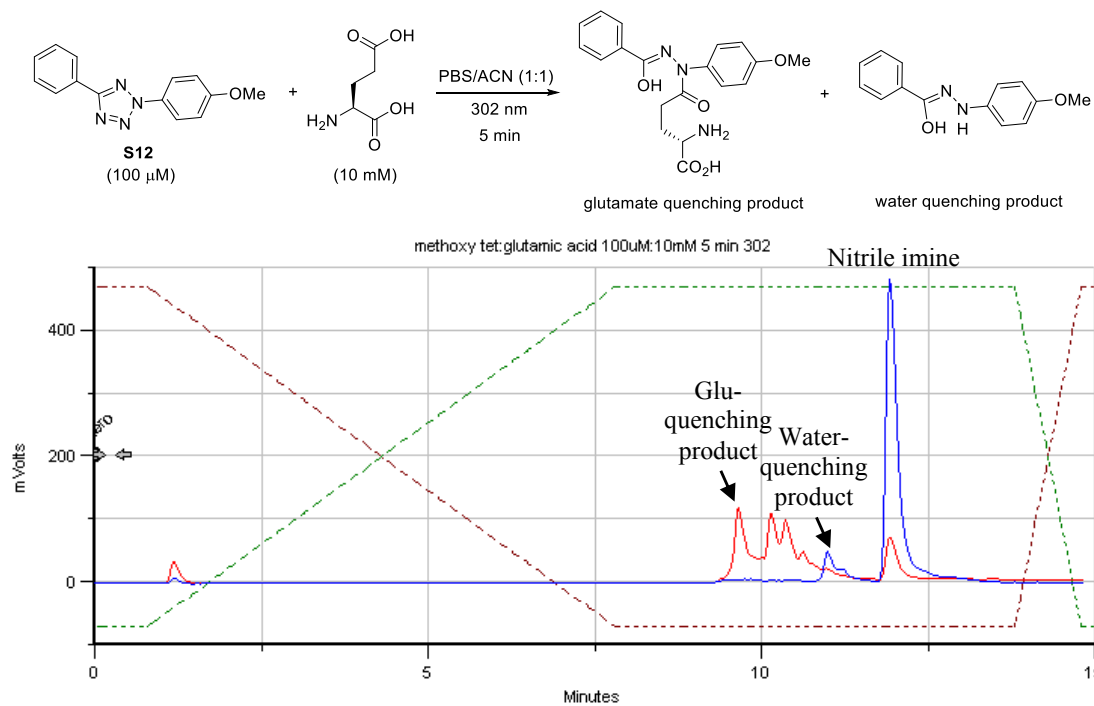
下図の c)が **diaryltetrazole (S12)** で、b)が **2-aryl-5-carboxytetrazole (S4)** の化合物です。図から分かるように、**S12** では、**Glu** によって架橋された生成物が得られる一方で、**S4** の化合物では同条件で架橋生成物はほとんど見られず、塩化物で **quench** された化合物が得られました。筆者たちは、**S4** で **Glu** 架橋が見られなかったことについて、反応性の高いカルボキシニトリルイミンが早く **quench** されるということなので、目的としない架橋反応を、**diaryl-tetrazole** を用いた化合物よりも抑えられる点で有利だとしています。ただ、個人的には、**10mM** の **Glu** を用いて架橋がほとんど進行しないのは反応性が低すぎるような気もしています。一方で、**BTK** と化合物 **1a** (**2-aryl-5-carboxytetrazole** 系) の反応では、**in vitro** で **25 μM** ながらも～**60%**収率で架橋が進行しています。（資料 p.26, 反応条件: **BTK / 1a = 2.5 μM / 25 μM**）そのため、液中のフラフラしているカルボン酸とは反応性が低く、**ligand** 付近にあるカルボン酸 (**Glu**) とは反応性が高いのではないかと考えています。

設計上の理由については、仮説になってはしまうのですが、おっしゃる通り合成上の都合だろうと考えています。片方をカルボニル基にすることでアミド結合を介して **ligand** と繋げやすくしていると考えています。また、芳香族部位を減らすことで平面性を下げ、非特異的な相互作用を防ぐ役割もあるかもしれないと推測しています。

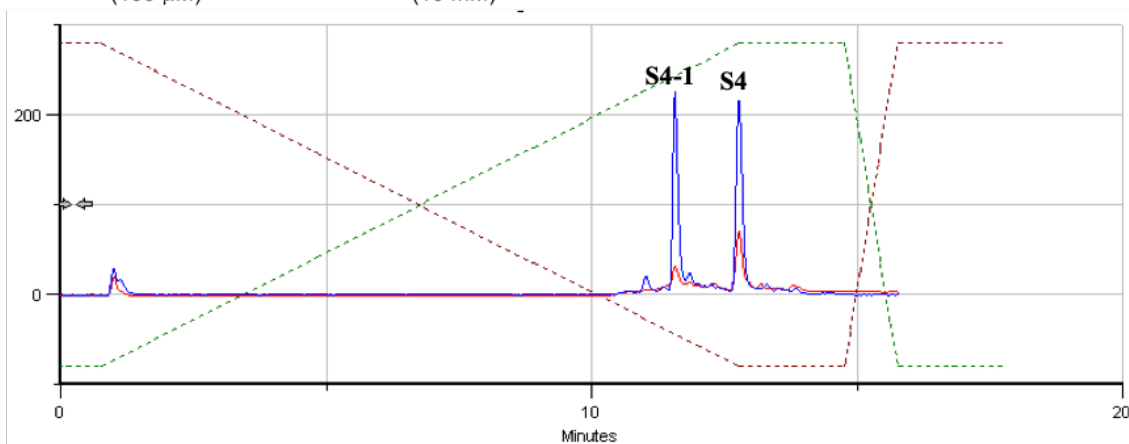
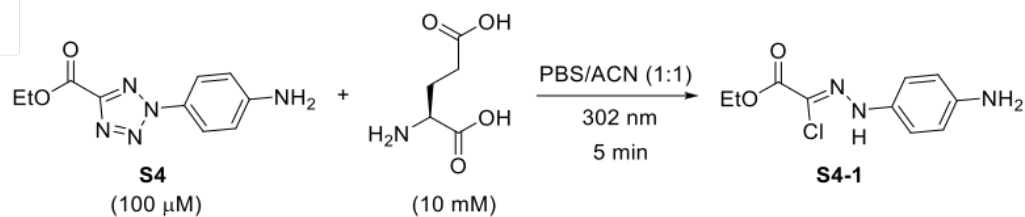
---

<sup>1</sup> Herner, A., et al. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, 138(44), 14609-14615.

c) Diaryltetrazole **S12** (100  $\mu$ M)+10 mM glutamic acid in PBS/ACN (1:1), irradiated at 302 nm for 5 min



b)



Herner, A., et al. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, 138(44), 14609–14615.

Q. p.13 で Additive を入れた時の副生成物は見えていますか？

**A. 今回紹介した論文<sup>2</sup>の中には、反応時の HPLC の結果が SI に載っていましたが、副生成物に関する記述は全くなかったです。**

しかしながら、他の論文<sup>3</sup>上で、化合物 **1e** (片方のベンゼン環パラ位にメチルエステルが置換した化合物) とメルカプトエタノールを反応させた例はあり、反応条件は違いますが **Cys** がニトリルイミンと共有結合を形成することは示されていました。そのため、**Cys** での副生成物としては **Cys** がニトリルイミンに求核付加した化合物が含まれると推測されます。また、今回中盤にお話しした ACT を用いた論文<sup>4</sup>においても、ACT とメルカプトエタノールの反応でメルカプトエタノール付加体が得られることが確認されています。

Q. p.39 について、架橋剤を用いた今回の系での Western blot の結果から一過性の結合だと判断していましたが、EGFR と Grb2 の結合が一過性だという過去の知見はあるのでしょうか？

**A. EGFR-Grb2 の結合に関して、調べた限りでは一過性だという過去の知見はなかったです。**

質疑応答の際に言及のあった論文<sup>5</sup>内に、EGFR-Grb2 の結合が一過性だという実験結果はなかったです。ただ、EGF 刺激応答のシグナル伝達経路で Grb2 と Shc1、EGFR と Shc1 の相互作用が一過性であるという論文<sup>6</sup>はありました。ここで、Shc1 タンパク質は、EGF 刺激のシグナル伝達経路に関わるタンパク質で EGFR と Grb2 とともに相互作用するタンパク質として知られています。今回紹介した論文<sup>7</sup>では、Western blot の結果と、Grb2、EGFR に関する結合の知見<sup>6</sup>から、EGFR-Grb2 の結合も一過性だろうと結論づけていました。

Q. (p.17) グルタミン酸の修飾はどの段階で見えるのでしょうか？MSMS はどこで切れるのでしょうか？

**A. タイムコースを取ってはいませんが、今回は UV 照射 10 分の段階で、LC-MS/MS で修飾を見えています。MSMS の切れ方については、SI にも載っていません。**

<sup>2</sup> Zhao, S., et al. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 4702-4705.

<sup>3</sup> Feng, W., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8732-8735.

<sup>4</sup> Herner, A., et al. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, 138(44), 14609-14615.

<sup>5</sup> Sorkin, A., et al. *Current Biology* **2000**, 10, 1395-1398.

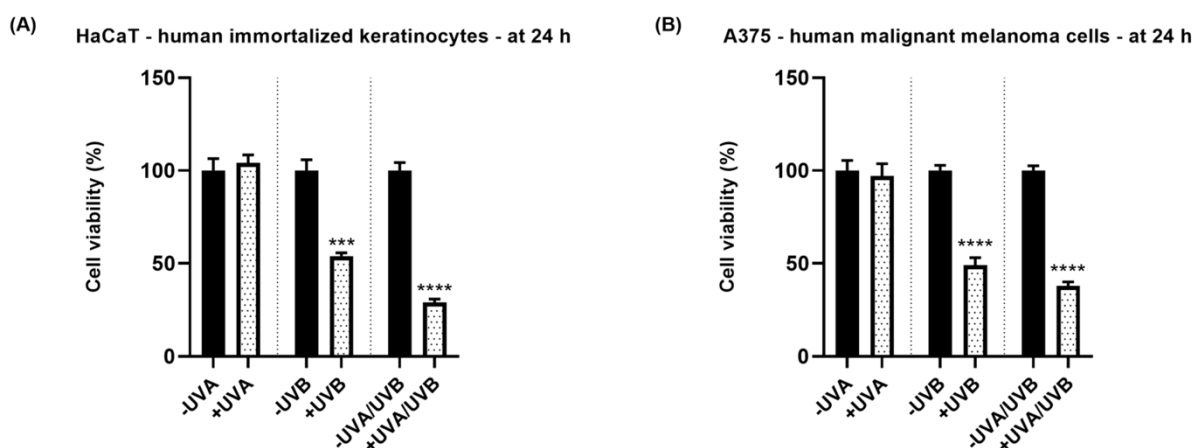
<sup>6</sup> Zheng, Y., et al. *Nature* **2013**, 499, 166-171.

<sup>7</sup> Tian, Y., et al. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139(17), 6078-6081.

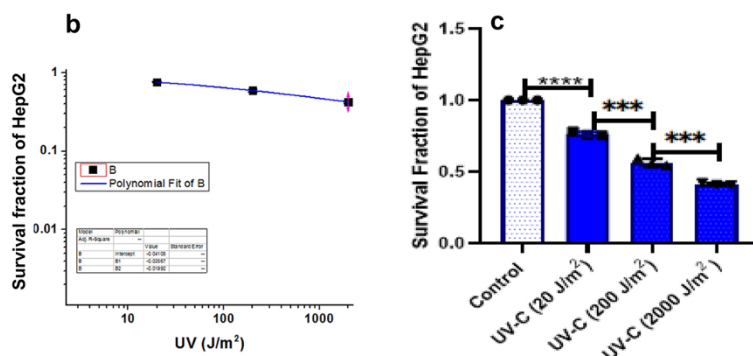
Q. 紫外線による細胞毒性はありますか？

**A. 紹介した三報<sup>2,4,7</sup>の本文中に細胞毒性によって細胞が死んでしまったという記述はなかったです。**

今回用いられている 302nm の紫外線ではないですが、紫外線照射時の細胞生存率を調べた実験<sup>8</sup> (下図) はありました。UVA (320 nm~400 nm)、UVB (280 nm~320 nm) であり、照射は UVA が 10 [J/cm<sup>2</sup>]、UVB が 0.5 [J/cm<sup>2</sup>] で、照射して 24h 後の生存率を調べています。今回の実験結果と照射時の単位が違うこと、今回の実験では紫外線照射の詳細が書かれておらず単位を揃えられないこと、そもそも細胞種が違うことから、単純な比較はできませんが、今回の系<sup>2,4,7</sup>に近い UVB 照射では半分ほどの細胞が死んでいることがわかります。そのため、302 nm の強さの紫外線を当てた際に細胞毒性が出ている可能性はありそうだと推察しました。また、今回用いている HepG2 細胞について、UV-B (280-320 nm) よりもエネルギーの高い UV-C (200-280 nm) については細胞毒性が示されていました<sup>9</sup>。結果としては、20 J/m<sup>2</sup> の弱い照射でも毒性が出ていることがわかります。また、今回使用した他の細胞種である K562 細胞についても、UVC 照射で細胞毒性が出ることがわかっています<sup>10</sup>。この結果からも 302 nm の紫外線照射によって細胞毒性が出ている可能性が示唆されます。



Gag, O., *Life* **2023**, 13(5), 1144.



Pujari, I., et al. *3 Biotech* **2021**, 11, 281.

<sup>8</sup> Gag, O., *Life* **2023**, 13(5), 1144.

<sup>9</sup> Pujari, I., et al. *3 Biotech* **2021**, 11, 281.

<sup>10</sup> Foresti, M., & Avallone, B. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2008**, 90, 8-16.

Q. Western blot の際、SDS による変性に耐えると言っていたが、SDS によって予期せぬクロスリンクが発生するなど悪影響は考えられるのでしょうか？

**A. 可能性は低いと考えられます。**

詳しく説明しませんでしたでしたが、大まかな実験手順としては、PBS に溶かした細胞溶解液 (cell lysate) に対して UV を 10 分間照射した後、30 分間インキュベートして、目的のタンパク質を抽出。1.2% SDS/PBS に溶解させたのちに、click 反応でビオチンを繋いで、avidin で濃縮し、Western blot を行っています。click 反応の前の段階で 1.2% の SDS 溶液に溶解させています。一般に SDS-PAGE の際の sample buffer は 2% SDS でタンパク質を変性させているので、1.2% SDS の条件は反応前の段階としては比較的 harsh であるといえます。発表時に触れたところは、このような厳しい条件を経ても HDAC が click 反応を経て取れてきているという点です。もしクロスリンクされていない化合物ならば、この変性の段階で相互作用が弱くなってしまい、アルキンタグがついた SAHA と HDAC が離れてしまい、click 反応後に biotin-avidin で濃縮してきても HDAC は釣れてこないはずですが、しかしながら、今回の実験結果では HDAC が検出できているので、SAHA と HDAC はクロスリンクしているだろうと結論づけています。SDS による予期せぬクロスリンクについてですが、まず UV 照射で反応活性種が生じた後 30 分間 incubation しているので、この間に活性種は H<sub>2</sub>O などで quench されていると考えられます。また、抽出の操作の際にも水を用いていることから SDS で処理する段階では反応活性種は系中にほとんど存在しないと推測されます。そのため、SDS による予期せぬクロスリンクは生じないだろうと考えています。

Q. p.16 で、12 の親和性はほとんど無いと考えてもいいですか？それともより弱い親和性のものは捨ってこれないということですか？

**A. ヒドロキサム酸を持つ化合物 11 よりも親和性は低いと考えていいと思います。**

12 は Zn<sup>2+</sup>でのキレートが弱いので HDAC との親和性はほとんどないと考えても問題ないと思います。11 と 12 の親和性の違いについて定量的なデータは論文内にはありませんでした。

Q. p.24 の親和性のアッセイをしたところで、タンパク質の選び方がよくわかりませんでした。

**A. タンパク質の選び方については、論文中に記述はなかったです。**

親和性を大幅に損なわないような化合物を選んできていると考えられます。BTK, BRD4 を選んだ詳細な理由は不明です。

Q. p.25 の JQ-1 の競合のところで、JQ-1 は十分量入っているということでもいいですか？4, 5, 6 は元の JQ-1 より親和性が高いという話でしたが、競合のところで JQ-1 に勝ってしまっているということはないですか？

**A. JQ-1 は probe の 50 倍の濃度入れているという記載があるので、十分量入っていると考えて良いと思います。競合のところで probe が JQ-1 に勝ってしまっている可能性はあると考えられます。**