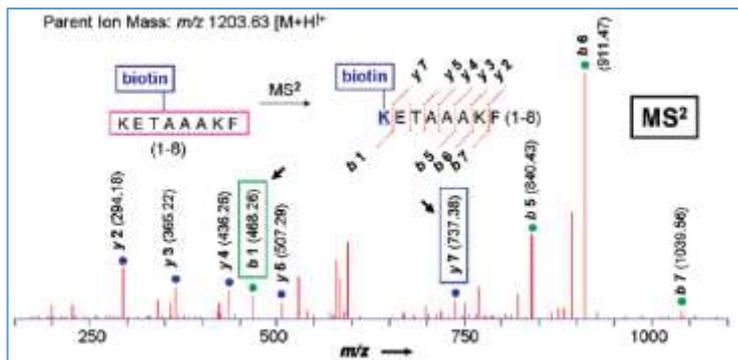


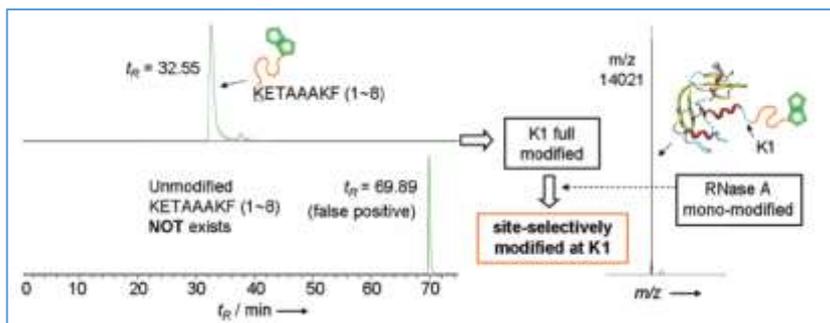
Site-Selective Biotinylation of RNase A using Biotin-TEO-Ethynyl-NHS

・ p11 : どういう実験データから残基選択性を見ているのか？

LC-MS/MS 解析により、右図に示すペプチドフラグメントで biotinylation が起こると分かりました。このペプチドは K1, K7 の二つのリジン残基を有している為、さらなる MS/MS 解析を行ったところ、K1 が修飾を受けた b1 の MS peak が検出され、K7 が修飾を受けた場合の y7 peak は一切検出されなかったために、K1 で修飾が起こっているとしました。

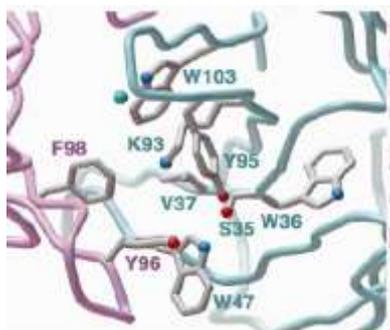


さらに XIC(extracted ion chromatography)を行ったところ、ビオチン修飾された fragment KETAAAKF がメインで得られ、修飾を受けていない fragment は検出されなかったことからビオチン修飾が K1 のみで起こっていることを示しています。



なお、MALDI-TOF-MS 解析によっても K1 位で選択的に修飾を受けることを示しています。

・ p24 : 一つのリジン残基は何故反応性が高いのか？



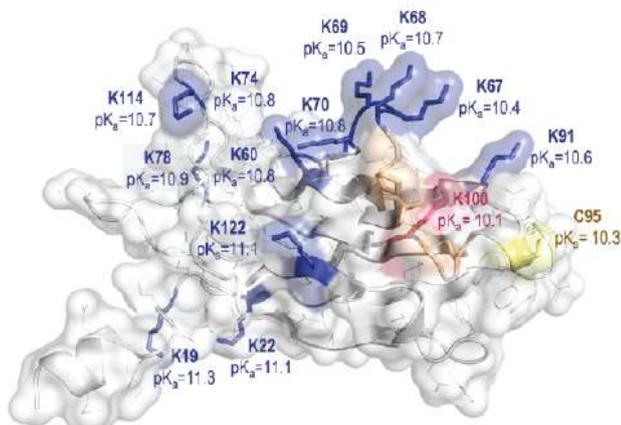
h38C2 において選択的に修飾を受ける疎水性残基 (K93) は、左図のような疎水性環境下にあり、反応性が高いことが知られています。

生理的条件下ではプロトン化を受けているリジン残基が疎水性環境下におかれることで、カウンターアニオンを失います。その結果アミンで存在する方が安定となるため、pKa が下がり反応性が高くなります。

・ p33 : リジンは何残基有るのか？

59 残基

・ p37 : 図の下には No Cys と書いてあるが、Cys は有るのか？



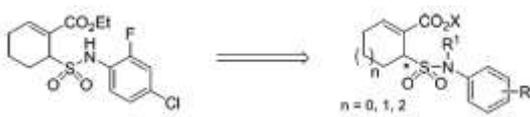
アップロードした資料にミスがありました。

申し訳ありません。

左図が正しいもので、システインは存在しています。

C2Am (14 Lys, 1 free Cys, no disulfides)
Predicted site of modification: K100; Observed: K100

・page 14: 武田ライブラリーからこのスルホナミドが見つかった経緯がわかりません。NO 産生阻害というのは、精製酵素を使ったアッセイ？そして、その阻害機構はその酵素が持つリジンのマイケルアクセプターへの付加？



このリード化合物が見つかった経緯ですが、様々文献を当たりましたがそれに関する記述はありませんでした。

LPSにより誘導されたマウスマクロファージ細胞系、RAW264.7 を最初の *in vitro* スクリーニングとして用いて、化合物をNO産生に対する抑制活性について評価しました。また、阻害活性はIC₅₀値として示され、NOの生成を抑制するのに必要とされる試験化合物の濃度を示しています。

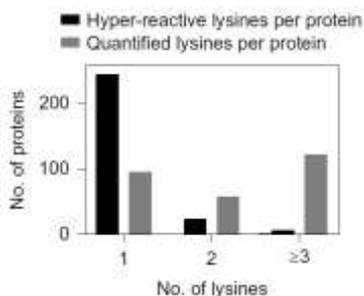
一酸化窒素合成酵素 (NOS) は、L-Arg から L-Cit と NO を合成する代謝反応に関与している酵素です。NOS は三種類のアイソザイムが存在しており、活性がカルシウムシグナルによって制御される nNOS や eNOS は生理機能の維持に必要な少量の NO を産生するのに対し、iNOS は炎症性刺激として知られる LPS などによって誘導されます。

NO阻害薬としては、(1) 細胞内へのArgの取り込みを阻害しNOSの基質を枯渇させる薬物、(2) NOS がArg の酸化触媒作用を行うために必要なコファクターの供給を減少させる薬物、(3) NADPH/Flavin類を介した電子の流れを阻害する薬物 (4) NOS 発現を阻害する薬物、(5) NOSへの基質の結合を阻害する薬物、(6) NOのスカベンジャー、(7) iNOSの酵素活性に必須なホモダイマー形成をターゲットとするNO産生阻害薬が知られています。本化合物はNO産生酵素の活性部位アミノ酸と反応することでNO産生を抑制しているものと思われます。

・slide 15: なぜ K64 選択的なのか？K64 はどうして反応性が高いのか

なぜ K64 の反応性が高いのかに関する考察もされていないのですが、sulfonamide compound のアミノ酸へのアクセスのしやすさや何らかの相互作用があるのかもしれない。

・p18: 図が何を意味しているのかわかりませんでした。ひとつのタンパクあたりせいぜい3つくらいしか、detect 出来なかったということ？



図中の data はそれぞれ、反応性の高いリジン残基 (black)、また反応性が低い一般的なリジン残基(gray)を示しています。

ただ一つの反応性の高いリジン残基をもつタンパクの数が多いことが分かります。

・p 37:計算からどのようにして反応する位置を予想するのか？

Software : Amber 16 (Assisted Model Building with Energy Refinement)

…カリフォルニア大学のコールマン教授らのグループによって生体分子のために開発された、モデリングおよび分子力学と動力学計算 MD シミュレーション プログラム。

Constant pH Molecular Dynamics simulations (CpHMD) により各リジン残基の pKa を求めています。pKa の低さから反応点を完全に予測できているタンパクもあれば、同程度の pKa を持つことから反応が予想されるリジン残基を絞るにとどまっているものもあります。

・p38: 結局 FITC つきのアミンを 100 当量使っているけど、だったらこの反応を 1 当量でやることの意味って？

通常リジンと反応する試薬を 100 当量使うと反応点や修飾数が制御できません。抗体に一つのマイケルアクセプター部位を導入することで、100 当量使う必要はありますが反応点や修飾数を制御できるメリットがあります。

・p36: conversion はどのようにしてだしているのか。

Bradford protein assay により反応前及び反応後精製した目的物の濃度を比較することにより算出しています。