

タンパク質糖鎖修飾の
逆行修飾を担う酵素に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻

博士後期課程

三浦 一輝

2017

タンパク質糖鎖修飾の
逆行修飾を担う酵素に関する研究

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻

博士後期課程

三浦 一輝

2017

目次

第1章 序論

1-1.	タンパク質の翻訳後修飾	1
1-2.	糖鎖を介したタンパク質の翻訳後修飾	1
1-3.	タンパク質糖鎖修飾過程における糖鎖の逆行修飾	4
1-4.	<i>N</i> -結合型糖鎖修飾過程における糖鎖末端の結合様式と修飾反応の形式	4
1-5.	真核生物における <i>N</i> -結合型糖鎖修飾	5
1-6.	研究目的	7

第2章 本論

2-1.	糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索	11
2-1-1.	糖鎖修飾関連酵素の <i>in silico</i> 解析に基づく蛍光基質の分子設計	12
2-1-2.	分子設計した蛍光基質の合成	16
2-1-3.	ヒト細胞を用いた標的酵素の探索および染色部位の同定	20
2-2.	セルベースアッセイによるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	26
2-2-1.	免疫染色法によるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	27
2-2-2.	蛍光イメージング法によるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	28
2-3.	光親和性標識法によるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	29
2-3-1.	光親和性プローブの分子設計および合成	30
2-3-2.	光親和性標識法による新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の単離および同定	32
2-4.	ゴルジ体局在 <i>GLB1</i> のケミカルノックダウンによる細胞内機能の解明を 目指した特異的阻害剤の探索	34

2-4-1. ゴルジ体局在 GLB1 特異的阻害剤探索のためのアッセイ系の構築	35
2-4-2. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索	35
第 3 章 結論	
3-1. 総括	38
第 4 章 実験の部	
4-1. ヒト培養細胞の調製	43
4-1-1. DMEM の調製	43
4-1-2. Trypsin 溶液の調製	44
4-1-3. ヒト細胞の培養	44
4-1-4. ヒト細胞の継代	44
4-2. 蛍光基質 1-13 を用いた新規糖鎖修飾酵素の探索	45
4-2-1. 蛍光基質 1-3 を用いた新規 β -N-アセチルグルコサミニダーゼの探索	45
4-2-2. Lyso-ID Green による蛍光基質 1-3 の染色部位の同定	46
4-2-3. Chloroquine による蛍光基質 1-3 の染色部位の同定	46
4-2-4. 蛍光基質 4-7 を用いた新規 β -ガラクトシダーゼの探索	47
4-2-5. Golgi-ID Green による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定	47
4-2-6. BODIPY TR ceramide による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定	48
4-2-7. Brefeldin A による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定	48
4-2-8. 蛍光基質 8-13 を用いた新規 α -L-フコシダーゼの探索	48
4-2-9. Lyso-ID Green による蛍光基質 8-13 の染色部位の同定	49
4-2-10. Chloroquine による蛍光基質 8-13 の染色部位の同定	49
4-3. Anti-GLB1 抗体を用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	50
4-4. TokyoGreen β -Gal 用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	51
4-5. 蛍光基質および光親和性プローブの合成	51

4-5-1. 各蛍光基質の共通部分および緑色蛍光団の合成	52
4-5-2. β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 1-3 の合成	53
4-5-3. β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 4-7 の合成	60
4-5-4. α - <i>L</i> -フコシダーゼのための蛍光基質 8-13 の合成	69
4-5-5. 光親和性プローブの合成	84
4-6. 蛍光基質 1-13 の蛍光スペクトル	89
4-6-1. 蛍光基質 1-3 溶液および蛍光色素溶液の調製	89
4-6-2. 蛍光基質 1-3 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定	90
4-6-3. 蛍光基質 4-7 溶液および蛍光色素溶液の調製	92
4-6-4. 蛍光基質 4-7 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定	93
4-6-5. 蛍光基質 8-13 溶液および蛍光色素溶液の調製	96
4-6-6. 蛍光基質 8-13 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定	97
4-7. CLC Drug Discovery Workbench によるドッキングモデルの構築	99
4-8. 光親和性標識法を用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定	100
4-8-1. 光親和性プローブ 14 を用いた標的酵素の光標識化	100
4-8-2. クリック反応による光標識化タンパク質へのビオチンの導入およびビオチン標識タンパク質の精製	100
4-8-3. ウェスタンブロットングによるビオチン標識タンパク質および GLB1 の検出	101
4-8-3-1. PVDF 膜転写のための溶液の調製	101
4-8-3-2. Avidin-HRP 抗体を用いたビオチン標識タンパク質の検出	102
4-8-3-3. GLB1 に対する抗体を用いた GLB1 由来タンパク質の検出	103
4-8-4. 精製タンパク質の LC-MS/MS 解析	103
4-8-4-1. LC-MS/MS 解析のための溶液の調製	103
4-8-4-2. LC-MS/MS 解析のための精製タンパク質の調製	104
4-8-5. タンパク質の LC-MS/MS 解析およびデータ処理	105

4-9. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の探索	106
4-9-1. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からの阻害剤探索のための蛍光基質溶液および阻害剤候補化合物の調製	106
4-9-2. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の一次スクリーニング	107
4-9-3. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の二次スクリーニング	108
4-9-4. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からの阻害剤探索のための蛍光基質溶液および阻害剤候補化合物の調製	108
4-9-5. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の一次スクリーニング	109
4-9-6. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の二次スクリーニング	110

参考文献

謝辞

第1章 序論

1-1. タンパク質の翻訳後修飾

タンパク質は核内に存在するゲノム DNA から RNA ポリメラーゼにより mRNA への転写後、リボソーム内で mRNA からタンパク質への翻訳の過程を経て生合成される。生合成された新生タンパク質は、小胞体からゴルジ体、さらに機能発現の場に輸送される間に、フォールディングされると同時に様々な翻訳後修飾を受けることが知られている [1]。これらタンパク質の翻訳後修飾は真核生物において普遍的に行われており、これまでの研究から真核生物であるヒト細胞では 300 種類以上の翻訳後修飾が知られている [2]。

これらタンパク質の翻訳後修飾は、可逆的修飾と不可逆的修飾の 2 種類に分類することができる。可逆的修飾には、リン酸化、メチル化、アセチル化、ニトロシル化などがあり [3-6]、不可逆的修飾には、糖鎖付加 (グリコシル化)、脂質付加、ユビキチン化などがある [3-6]。これら翻訳後修飾は、細胞内のシグナル伝達などのタンパク質の機能発現に重要な役割を果たすことが広く知られている [1, 3-6]。

1-2. 糖鎖を介したタンパク質の翻訳後修飾

数多くあるタンパク質の翻訳後修飾の中でも、不可逆的な翻訳後修飾の 1 つである糖鎖修飾は、タンパク質のコンセンサス配列「Asn-X-Ser/Thr (X: 任意のアミノ酸残基)」内のアスパラギン残基に糖鎖が付加される *N*-結合型糖鎖修飾、セリンまたはスレオニン残基に糖鎖が付加される *O*-結合型糖鎖修飾、タンパク質の「Trp-X-X-Trp (X: 任意のアミノ酸残基)」アミノ酸配列中トリプトファン残基にマンノースが付加される *C*-結合型糖鎖修飾に分類される。

N-結合型糖鎖修飾は、リボソームにて合成された新生タンパク質が小胞体内

腔に入り込み、オリゴ糖転移酵素 (OST, EC 2. 4. 1. 119) によってアスパラギン残基に 14 糖からなる糖鎖 ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) が付加されることから始まり、続いてグルコシダーゼ I および II によってグルコース残基が除去され、 $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖を形成する。これら糖鎖はさらにグルコシダーゼ II によってグルコース残基が除去され、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖となる [7-9]。その後、本糖鎖を有するタンパク質は適切な立体構造をとるまで UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素によってグルコース残基の付加および分子シャペロンであるカルネキシンおよびカルレティキュリンによるタンパク質の折り畳み促進を経て、グルコシダーゼ II によって再度グルコース残基除去のサイクルを繰り返す [7-9]。これらサイクルはタンパク質の品質管理の中心的な役割を担っている [7-10]。その後、タンパク質の糖鎖は小胞体マンノシダーゼによってマンノース残基が除去され、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖となり、タンパク質はゴルジ体に輸送される。ゴルジ体に輸送されたタンパク質の糖鎖は、ゴルジ体マンノシダーゼ IA/IB/IC によって順次トリミング、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素により β -1, 2-GlcNAc 残基、ガラクトース転移酵素より β -1,4-Gal 残基、フコース転移酵素より α -1,6-Fuc 残基、シアル酸転移酵素より α -2,6-NeuNAc 残基によって糖付加が行われ、タンパク質は機能発現の場へと輸送される [7, 11-13] (Figure 1)。

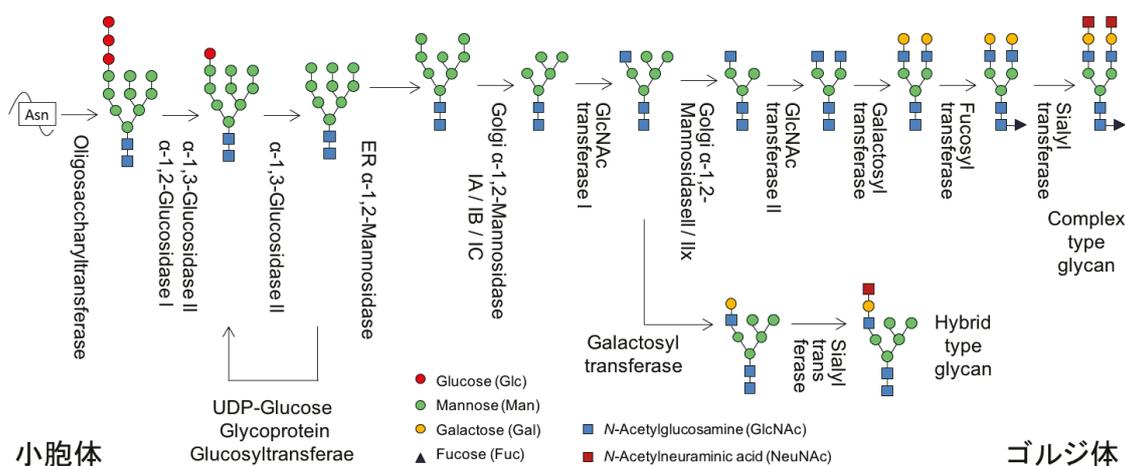


Figure 1. ヒト細胞における *N*-結合型糖鎖修飾経路

O-結合型糖鎖修飾では、まずゴルジ体に輸送されたタンパク質に *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素によって、タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に *N*-アセチルガラクトースが付加されることから始まり、ガラクトース転移酵素、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素によって糖付加が行われ、多数の Core 構造を持った O-結合型糖鎖が形成される [11, 14, 15]。その後、ガラクトース転移酵素、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素、シアル酸転移酵素、フコース転移酵素によって糖鎖末端に対して糖残基が付加されたのち、タンパク質は機能発現の場へと輸送される [11, 14, 15] (Figure 2)。

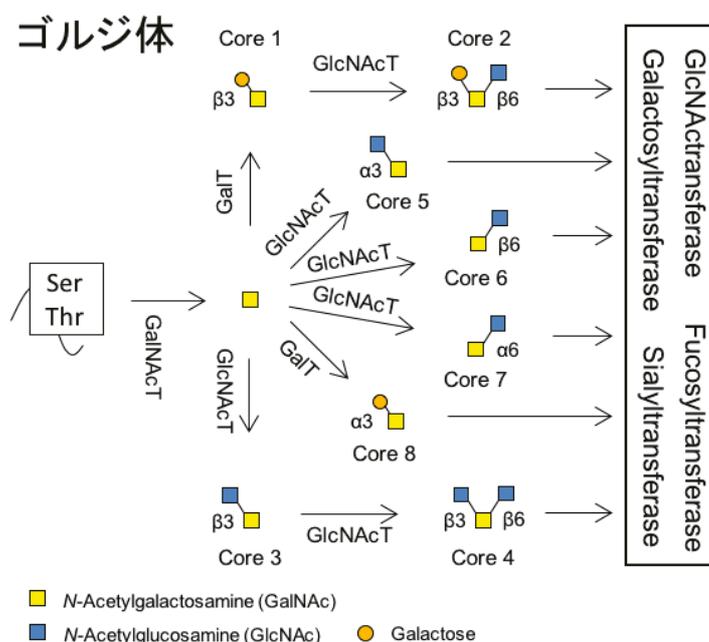


Figure 2. ヒト細胞のゴルジ体における O-結合型糖鎖修飾経路

C-結合型糖鎖修飾では、小胞体内に輸送されたタンパク質のトリプトファン中のインドール部分の 2 位の炭素原子に対してマンノースが付加されたのち、タンパク質は機能発現の場へと輸送される。C-結合型糖鎖修飾では酵素反応によってマンノース残基が付加されることは明らかとなっているが、マンノース転移を担う酵素である C-マンノース転移酵素は不明である。しかし、近年 *DPY19L3 gene* から生合成されるタンパク質が C-マンノース転移を担う酵素とし

て同定され、他にもいくつかのタンパク質が同様の酵素として報告がされている [16, 17]。

1-3. タンパク質糖鎖修飾過程における糖鎖の逆行修飾

生体内では、タンパク質の翻訳後修飾を含め種々の糖鎖修飾がなされており、多様な糖質加水分解酵素および糖転移酵素がその修飾に関与している。これら既知糖鎖修飾の経路において、タンパク質糖鎖の加水分解反応と糖鎖への糖転移反応に着目すると、*N*-結合型糖鎖修飾ではタンパク質への 14 糖からなる糖鎖の転移、小胞体グルコシダーゼおよび小胞体・ゴルジ体マンノシダーゼによる糖鎖の加水分解、糖転移酵素による糖転移という経路で修飾が進行する [7-9]。しかしながら、小胞体には、適切な折り畳みを形成していないタンパク質の糖鎖に対して、糖転移反応によってグルコースを付加し、一段階前の糖鎖修飾過程に戻す、不良タンパク質に対する糖鎖修飾の修復機能を担う逆行の糖鎖修飾が存在する [7-9]。それに対して、ゴルジ体には小胞体に存在するような逆行の糖鎖修飾の報告はなく、糖鎖修飾の修復機構は存在しない。

O-結合型糖鎖修飾では、糖転移酵素による糖付加という経路のみで修飾が進行し [11, 14, 15]、*N*-結合型糖鎖修飾に存在するような逆行の糖鎖修飾の報告はない。また、*C*-結合型糖鎖修飾は、研究初期の段階にあり、現在は糖転移酵素による糖付加という経路のみが報告されており [16]、*N*-結合型糖鎖修飾に存在するような逆行の糖鎖修飾の報告はない。

1-4. *N*-結合型糖鎖修飾過程における糖鎖末端の結合様式と修飾反応の形式

生体内における糖鎖修飾過程において、*O*-結合型や *C*-結合型糖鎖修飾では一種類の糖残基に対して様々な糖鎖付加が糖転移酵素によって行われるのに対し、

N-結合型糖鎖修飾では、糖鎖の修飾は糖鎖の非還元末端で行われ、糖鎖末端における糖質の種類および結合様式によって、続いて起こる糖鎖修飾が異なる。そこで、N-結合型糖鎖修飾過程において、基質となるタンパク質糖鎖の非還元末端の結合様式と続いて起こる修飾反応の形式に着目し、研究を進めた。

糖鎖修飾が開始される小胞体に注目すると、糖鎖修飾酵素の基質となるタンパク質糖鎖の非還元末端はすべて α -結合となっており、その末端糖残基への修飾は加水分解反応のみである。次の修飾の場であるゴルジ体では、糖鎖修飾酵素の基質となるタンパク質糖鎖の非還元末端には、 α -結合と β -結合が存在する。糖鎖の非還元末端が α -結合の場合、糖鎖の加水分解反応と糖鎖への糖転移反応による糖鎖修飾過程が存在する。それに対して、糖鎖末端が β -結合の場合、糖鎖の加水分解過程は存在せず、糖鎖への糖転移反応のみが存在する。

1-5. 真核生物における N-結合型糖鎖修飾

タンパク質の翻訳後修飾における糖鎖修飾は真核生物に特有の翻訳後修飾の一つであり、生物種によって異なる糖鎖が糖鎖修飾には利用されている。例えば、真核生物のモデル生物として数多くの研究が行われている出芽酵母の 1 種である *Saccharomyces cerevisiae* における N-結合型糖鎖修飾は、小胞体において $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の 13 糖からなる糖鎖がタンパク質に付加されることから始まり、グルコシダーゼ I, II によるグルコース残基の除去およびマンノシダーゼによるマンノース残基の除去が行われたのち、タンパク質はゴルジ体に輸送される [18]。その後、ゴルジ体ではマンノース転移酵素により、数多くのマンノース残基がタンパク質糖鎖に糖転移されることで、多数のマンノース残基で構成される酵母特有の N-結合型糖鎖となる [18]。このように、哺乳動物であるヒト細胞と同じ真核生物である酵母では、同じ真核生物であるにも関わらず、ヒト細胞とは異なる N-結合型糖鎖が糖鎖修飾に利用され、糖鎖修飾経路もヒト細胞と大きく異なる。

植物細胞における N-結合型糖鎖修飾は、哺乳動物であるヒト細胞と同様の 14

糖からなる $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖が小胞体でタンパク質に付加後、グルコシダーゼ I, II によるグルコース残基およびマンノシダーゼによるマンノース残基のトリミングが小胞体内で行われ、次のゴルジ体ではマンノシダーゼによるマンノース残基のトリミング、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素による *N*-アセチルグルコサミン残基のタンパク質糖鎖への糖付加まではヒト細胞と同一の *N*-結合型糖鎖修飾経路である [19, 20]。しかし、植物細胞ではタンパク質糖鎖への *N*-アセチルグルコサミン残基の付加後は、キシロース転移酵素によるキシロース残基、フコース転移酵素による 3 つのフコース残基、ガラクトース転移酵素による 2 つのガラクトース残基が糖付加され、シアル酸転移酵素は存在せずタンパク質糖鎖へのシアル酸の転移は起こらない [19, 20]。このように、植物細胞では、ヒト細胞とは異なる糖質が *N*-結合型糖鎖修飾に利用され、かつ *N*-結合型糖鎖修飾の経路もヒト細胞と大きく異なる。したがって、酵母と同様に植物細胞の *N*-結合型糖鎖修飾についてもヒト細胞の *N*-結合型糖鎖修飾と比較することは適していないと考えられる。

昆虫細胞における *N*-結合型糖鎖修飾は、ヒト細胞と同様に 14 糖からなる糖鎖 ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) 付加から始まり、グルコース残基およびマンノース残基が除去されたのち、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素による GlcNAc 残基の糖転移が行われ、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖を形成する [21]。その後、ヒト細胞では、順次糖転移酵素によるガラクトース残基およびシアル酸残基の付加が行われるが、昆虫細胞ではガラクトース転移酵素の活性が弱く、かつ β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼが存在するためコンプレックス型糖鎖の生合成が大きく制限される [22, 23]。しかし、昆虫細胞にはシアル酸転移酵素が存在し、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの活性を阻害することで、ヒト細胞と同様のコンプレックス型糖鎖 ($\text{NeuNAc}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$) が生合成される [24]。このように、昆虫細胞では、ヒト細胞に存在しない β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼが存在するものの、ヒト細胞とは同一の糖質が *N*-結合型糖鎖修飾に利用され、*N*-結合型糖鎖修飾経路も同一である。それゆえ、同じ真核生物でも生物種によって糖鎖修飾は大きく異なっているが、昆虫細胞とヒト細胞の *N*-結合型糖鎖修飾

を比較することは妥当である。

ヒト細胞と昆虫細胞では糖鎖修飾に利用される糖鎖および糖鎖修飾プロセスは同一ではあるが、昆虫細胞ではゴルジ体においてタンパク質糖鎖末端が β -結合の場合でも、タンパク質糖鎖への糖転移反応だけでなく、糖鎖の加水分解反応も報告されており、昆虫細胞のゴルジ体において糖鎖の加水分解反応を担う酵素である β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼはコンプレックス型糖鎖 (NeuNAc₂Gal₂GlcNAc₂Man₂GlcNAc₂) が形成される過程で出現するタンパク質糖鎖末端の β -GlcNAc 残基を加水分解することで、昆虫型糖鎖 (Man₃GlcNAc₂) の形成経路に導く、つまり本酵素は昆虫細胞においてコンプレックス型糖鎖と昆虫型糖鎖の発現量の調節を担っていると示唆される [24-26]。しかし、昆虫細胞と同じ真核生物であるヒト細胞では、ゴルジ体の糖鎖修飾は一方向のみであり、かつタンパク質糖鎖末端が β -結合の場合でも糖鎖の加水分解反応を担う酵素の報告はなく、コンプレックス型糖鎖 (NeuNAc₂Gal₂GlcNAc₂Man₂GlcNAc₂) とハイブリット型糖鎖 (NeuNAcGalGlcNAcMan₅GlcNAc₂) の発現量がどのように調節されているかは不明である。

このことから、ヒト細胞とほぼ同じ糖鎖修飾プロセスを有する昆虫細胞で糖鎖の発現量調節を担うと示唆される酵素が存在することから、ヒト細胞でも昆虫細胞のゴルジ体に存在する糖鎖の発現量調節を担う β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに相当するこれまでに報告のない酵素が糖鎖の発現量調節機構を担っていることが考えられる。

1-6. 研究目的

N-結合型糖鎖修飾過程の分析から導かれる推論として得られた、ヒト細胞のゴルジ体における不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構の存在を明らかにするために、本研究では2つの仮説をたて立証を試みる。

ヒト細胞の小胞体では、不良タンパク質の糖鎖に対して1分子のグルコース

残基を糖転移し、一段階前の糖鎖修飾過程に戻すグルコース転移酵素が報告されており、本酵素は不良糖鎖修飾の修復機構を担っている [7-10]。しかし、ゴルジ体では小胞体に存在するような不良糖鎖修飾の修復を担う機構が報告されておらず、不良糖鎖修飾の修復機構が存在することが考えられるが、現状ではゴルジ体で生じた不良糖鎖修飾がどのように修復されているかは不明である。そこで、1つ目の仮説としてゴルジ体にも小胞体に存在するような不良糖鎖修飾の修復機構を担う逆行の糖鎖修飾に関する酵素として、ゴルジ体に α -または β -グリコシダーゼが存在すると仮定した。本仮定に基づき、既知の糖鎖修飾過程 [7, 11-13] を調べた結果、糖鎖の非還元末端には β -*N*-アセチルグルコサミニド結合、 β -ガラクトシド結合、 α -*L*-フコシド結合、 α -シアリド結合があり、それら結合をそれぞれ分解する β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -*L*-フコシダーゼ、 α -シアリダーゼの4種類の酵素を仮定した。

ヒト細胞では、ほぼ同じ糖鎖修飾過程を持つ昆虫細胞に存在するようなゴルジ体における糖鎖の発現量調節機構は報告がなく、糖鎖発現量がどのように調節されているかは不明である。したがって、ヒト細胞のゴルジ体でも糖鎖の発現量調節機構を持つことが考えられる。そこで、2つ目の仮説としてヒト細胞のゴルジ体においても、昆虫細胞において糖鎖発現量の調整を担う β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに相当する酵素が存在し、糖鎖の非還元末端が β -結合のときも加水分解反応による糖鎖修飾が生じると仮定した。本仮定に基づき、既知のゴルジ体糖鎖修飾過程 [7, 11-13] を調べた結果、糖鎖の非還元末端には β -*N*-アセチルグルコサミニド結合、 β -ガラクトシド結合があり、それら結合をそれぞれ分解する β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼの2種類の酵素の存在を仮定した。

仮定した酵素である β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼは、コンプレックス型糖鎖修飾経路においてタンパク質糖鎖末端から *N*-アセチルグルコサミンまたはガラクトース残基を取り除き、一段階前の糖鎖修飾過程に戻すことで不良糖鎖修飾の修復、または *N*-結合型糖鎖修飾過程のコンプレックス型糖鎖とハイブリット型糖鎖の分岐付近で *N*-アセチルグルコサミンまたは

ガラクトース残基が糖転移酵素によりタンパク質糖鎖に糖転移されることから糖鎖の発現量調節を担う酵素であることが予想される。

それに対して、コンプレックス型糖鎖修飾過程の最終段階でフコースまたはシアル酸がタンパク質糖鎖に糖転移されることから、仮定した α -L-フコシダーゼ、 α -シアリダーゼはタンパク質糖鎖からフコースまたはシアル酸残基を加水分解することで不良糖鎖修飾の修復を果たす酵素であることが期待される。

本研究では、仮定したこれら酵素を探索し、発見した酵素の糖鎖修飾における役割の解明を目指して、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素を蛍光イメージング可能な蛍光基質プラットフォームの開発を第一の研究目的とした。これら蛍光基質プラットフォームは、糖鎖修飾に関与するさまざまな糖質加水分解酵素の活性部位構造を *in silico* で解析し、これら解析結果に基づいて酵素の活性部位に最適な蛍光基質構造を設計することで開発し、設計した基質を有機合成化学的手法により合成する。

第二の研究目的として、ヒト細胞内糖鎖修飾において、ゴルジ体で生じた不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構を担う酵素の存在を明らかにすることを旨として、仮定した糖質加水分解酵素活性の探索および発見した酵素活性を持つ酵素の同定を試みる。本研究では、仮定した酵素は前後の糖鎖修飾反応に大きな影響を与えることが予想される。そこで、まず仮定した 4 種類の糖質加水分解酵素活性のうちでも、前後に別の糖鎖修飾が存在する β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよび α -L-フコシダーゼの 3 種類の糖質加水分解酵素を標的とし、これら酵素に由来する活性であるゴルジ体 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼおよびゴルジ体 α -L-フコシダーゼの探索および発見した酵素活性を持つ酵素の同定を試みる。また、糖鎖修飾の最終段階であり続いて起こる糖鎖修飾反応が存在しないゴルジ体 α -シアリダーゼは今後の研究課題とした。標的酵素の探索は、開発した蛍光基質プラットフォームを用いた蛍光イメージングによりヒト細胞から探索し、仮定した酵素活性を発見できたならば、免疫染色などの細胞アッセイおよび光親和性標識法により標的酵素の同定を行う。

第三の研究目的として、発見した酵素が不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調節機構に関与する酵素であるかをケミカルノックダウン法により解明するため、発見した酵素に対する特異的阻害剤の探索を試みる。これら阻害剤は、開発した蛍光基質を用いた阻害剤探索系を構築したのち、本探索系を用いて公的化合物ライブラリから探索を行う。

これら 3 つの研究を試みることで、ヒト細胞における不良糖鎖修飾の修復または糖鎖発現量調節を担う逆行の糖鎖修飾に関係する酵素の探索が蛍光基質プラットフォームの開発で可能となり、さらに特異的阻害剤の探索によってヒト細胞のゴルジ体における不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構の解明が可能となる。

また、仮定した酵素を発見することができれば、タンパク質の翻訳後修飾における新規な糖鎖修飾過程の発見となり、ヒト細胞におけるタンパク質の糖鎖修飾システムの解明に大きく寄与するだけでなく、翻訳後修飾研究の発展にも大きく寄与することが期待できる。

第2章 本論

2-1. 糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索

これまでに多くのタンパク質糖鎖修飾の研究がなされているが、仮定した3つの酵素が報告されていない理由として以下の3つが考えられる。1つ目は、それら酵素に対する基質の開発が十分でないためと考えた。一般的に糖鎖修飾に関与する加水分解酵素は糖鎖非還元末端のいくつかの糖残基を認識する酵素である。しかしながら、糖質加水分解酵素に対する市販の蛍光基質は糖残基に直接蛍光色素を結合させたものしかない。それゆえ、市販の蛍光基質は糖鎖非還元末端のいくつかの糖残基を認識する糖鎖修飾に関与する酵素には適していないと考えられる。2つ目は、糖鎖修飾に関与する酵素は、エネルギー獲得系のTCA回路や解糖系を担う糖質関連酵素と比べて圧倒的に細胞内の存在量が少ない。3つ目は、糖鎖修飾プロセスそのものが遺伝子情報として規定されていないことがある。これまでに数多くの糖質加水分解酵素が発見され、これら酵素遺伝子も明らかにされているが、遺伝子情報から糖質加水分解酵素であるかを明らかにするのは可能であるが、糖鎖修飾プロセスのどの過程に関与するかを推測するのは困難である。それゆえ、仮定した糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素を発見するためには、これら問題点を解決することが可能な基質の開発とそれに基づく酵素の探索が必要となると考えた。

そこで、本研究では1つ目の問題点を糖鎖の逆行修飾が存在する小胞体においてN-結合型糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素（小胞体グルコシダーゼ II および小胞体マンノシダーゼ）の活性部位構造に基づいて、これら酵素に適した基質を開発することで解決、2つ目および3つ目の問題点を細胞内に微量しか存在しない酵素の微弱な酵素活性でも感度良く検出可能な量子収率の高く、小胞体またはゴルジ体のpHの違いに影響を受けず生体内に存在するすべてのpH領域で感度良く蛍光を検出することが可能な蛍光色素、かつ糖鎖修飾の場である小胞体およびゴルジ体でリアルタイムに酵素活性を検出可能な開発した蛍光基

質を用いた蛍光イメージング法によって解決することが可能であると考え、本手法を用いて糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索を試みた。

2-1-1. 糖鎖修飾関連酵素の *in silico* 解析に基づく蛍光基質の分子設計

蛍光イメージング法を用いて、仮定した糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素を探索するためには、これら酵素に適合する蛍光基質が必要となる。そこで、これら蛍光基質を開発するため、*N*-結合型糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の活性部位構造をタンパク質-リガンドドッキングシミュレーションを用いて解析した。*N*-結合型糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素として、小胞体において糖鎖修飾に関与する小胞体 α -グルコシダーゼ II (PDB ID: 5IEE) [27] および小胞体 α -マンノシダーゼ (PDB ID: 1X9D) [28] の立体構造が明らかになっていることから、これら 2 つの酵素を選択し、これら酵素と天然基質とのドッキングシミュレーションを行い、活性部位構造の解析を試みた。その結果、これら酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示された (Figure 3)。

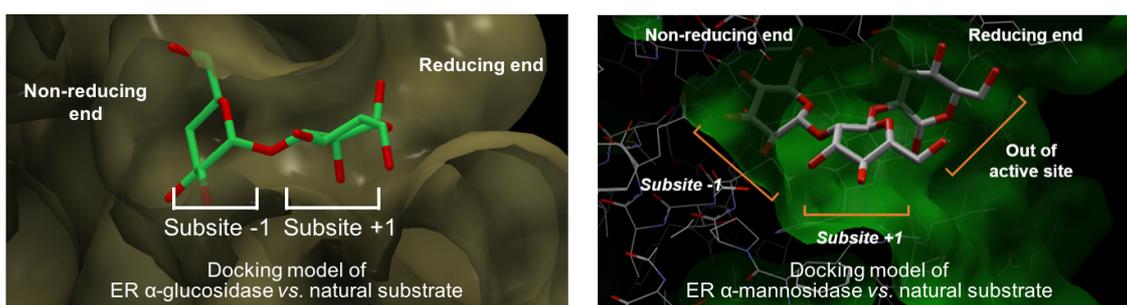


Figure 3. 糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の活性部位の *in silico* 解析

この結果から、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の加水分解酵素であることが一般的な特徴であると考えられた。

そこで、これら解析結果に基づいて糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の活性部位構造を考慮した蛍光基質の分子設計を行った。一般的に蛍光色素は分子サイズが大きく、糖残基に直接蛍光色素を結合させた蛍光基質では蛍光色素が糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素が有する **Subsite +1** に適合しないと考えられる (Figure 4A)。そこで、**Subsite +1** に適合する蛍光基質とするために、糖残基に直接蛍光団を結合させるのではなく、糖残基とほぼ同じ分子サイズであるリンカーとして導入することとした。しかしながら、リンカーを導入することで酵素反応により蛍光色素のみを遊離させることが不可能となる。そこで、ベンジル基をリンカーとして導入し、キノンメチド開裂反応を利用した蛍光基質とすることで酵素反応により蛍光色素のみを遊離させることが可能となり、かつ **Subsite -1** および **Subsite +1** を持つ糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素に適した蛍光基質となると考え、本蛍光基質を設計した (Figure 4B)。なお、設計した蛍光基質に用いたキノンメチド開裂反応は、酵素によりグリコシド結合およびエーテル結合が加水分解されることで、自発的な電子の移動後、開裂反応が引き起こされ、最終的に 4-hydroxybenzyl alcohol と蛍光色素を生じる反応である [29, 30] (Figure 5)。

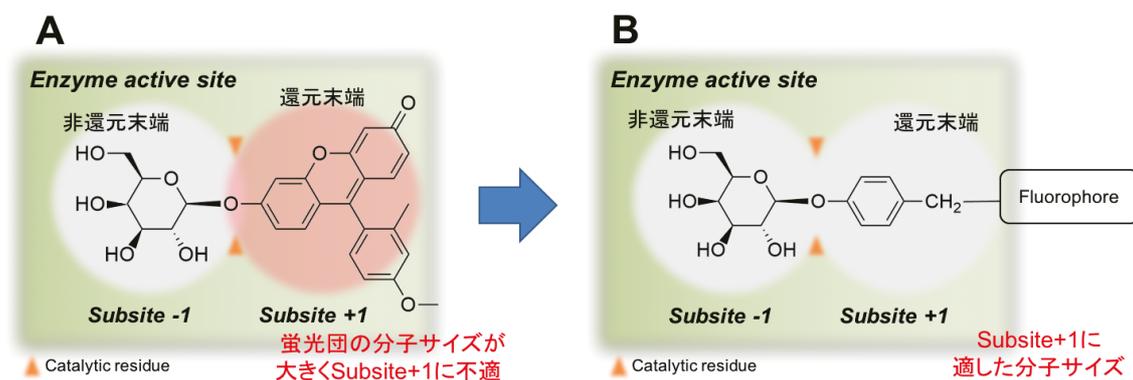


Figure 4. *in silico* 解析結果に基づいた蛍光基質の分子設計

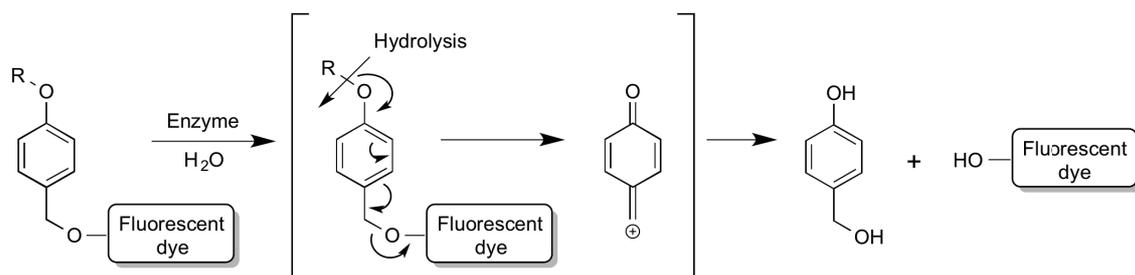


Figure 5. キノンメチド開裂反応の概略

また、仮定した酵素活性を細胞内で感度良く検出するためには、細胞膜透過性が高い蛍光色素とする必要がある。これまでの研究から、糖部分の水酸基をアセチル化することで、細胞膜透過性を向上させることができ、細胞膜透後は細胞内のエステラーゼによりアセチル基が加水分解されることで標的酵素に影響がなく、酵素活性を可視化することが可能な蛍光基質がいくつか開発されている [31, 32]。そこで、蛍光基質に含まれる糖部分の水酸基をアセチル化することで、細胞膜透過性の高い蛍光基質とした。

さらに、蛍光基質に用いる蛍光色素として、細胞内で仮定した酵素活性を感度良く検出するため、量子収率が高く、pH 依存性が低く、蛍光色素の励起条件下での消光可能な蛍光色素が必要となる。加えて、一般的な蛍光顕微鏡では赤・青・緑色蛍光を観察可能なフィルターが汎用されていることから、これらすべての条件を満たす蛍光色素として、赤色蛍光色素である *resorufin*、青色蛍光色素である 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (TFMU)、緑色蛍光色素である 2-methyl TokyoGreen (2MeTG) [33] を選択し、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3**、 β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7**、 α -*L*-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** を設計した (Figure 6)。

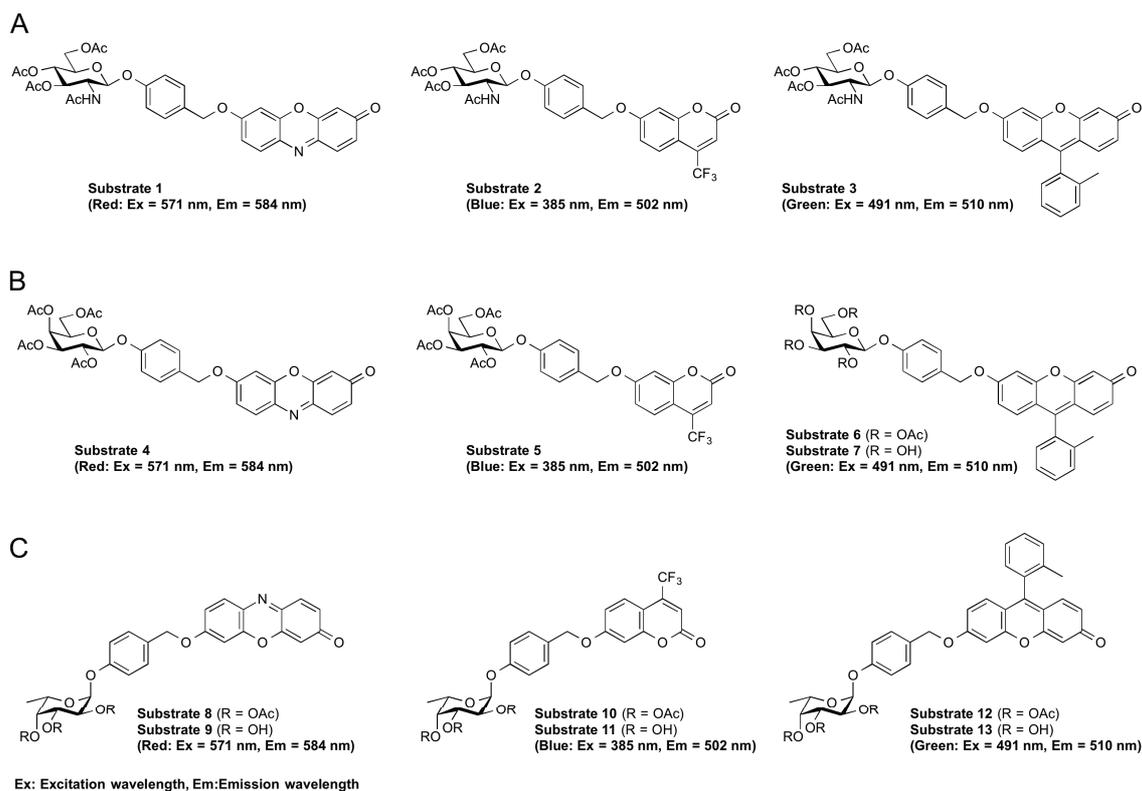
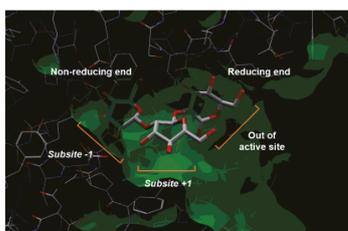
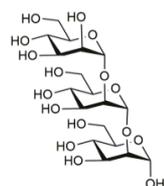


Figure 6. 分子設計した蛍光基質の構造

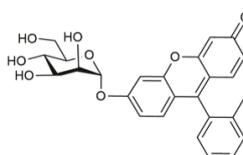
- (A) β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** の構造
- (B) β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** の構造
- (C) α -*L*-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** の構造

次に、設計した蛍光基質が糖鎖修飾に関与する酵素に適合するか確認するため、設計した蛍光基質と小胞体 α -マンノシダーゼのタンパク質-リガンドドッキングシミュレーションを試みた。その結果、設計した蛍光基質は小胞体 α -マンノシダーゼは天然基質と同様に活性部位に適合していることが示された (Figure 7)。この結果から、本分子設計を採用した蛍光基質は糖鎖修飾に関与する酵素の良好な基質となることが示唆された。

天然オリゴ糖基質



市販基質の分子設計



採用した分子設計

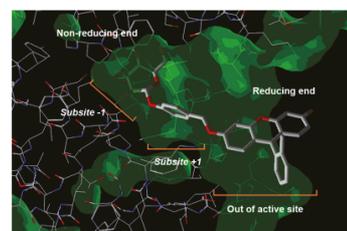
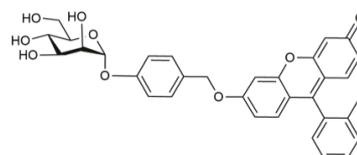


Figure 7. *in silico* による各種基質の小胞体 α -マンノシダーゼへの適合性解析

2-1-2. 分子設計した蛍光基質の合成

設計した蛍光基質は糖鎖修飾に関与する酵素の良好な基質となることが確認できたため、次に設計した蛍光基質の合成を行なった。蛍光基質の合成は、合成途中段階でキノンメチド開裂反応が発生しない合成戦略とし、すべての蛍光基質は各単糖を出発原料として、ベンジル基を導入したのち、各蛍光色素を導入する戦略で合成を試みた。

まず、リンカーとしてのフェニル誘導体および緑色蛍光団としての 2MeTG は市販されていないため、両化合物の合成を行った。リンカーは 4-hydroxybenzyl alcohol を出発原料として、*tert*-butyldimethylsilyl (TBS) 基で一方の水酸基を保護することで化合物 **15** を得た [29, 30]。また、緑色蛍光団は 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone を出発原料として、脱水環化することによって化合物 **16** を得た。次に化合物 **16** の水酸基を TBS 基で保護し化合物 **17** とし、*o*-tolylmagnesium bromide によりトリル基を導入、TFA により TBS 基を脱保護することで 2MeTG である化合物 **18** を得た [33] (Figure 8)。

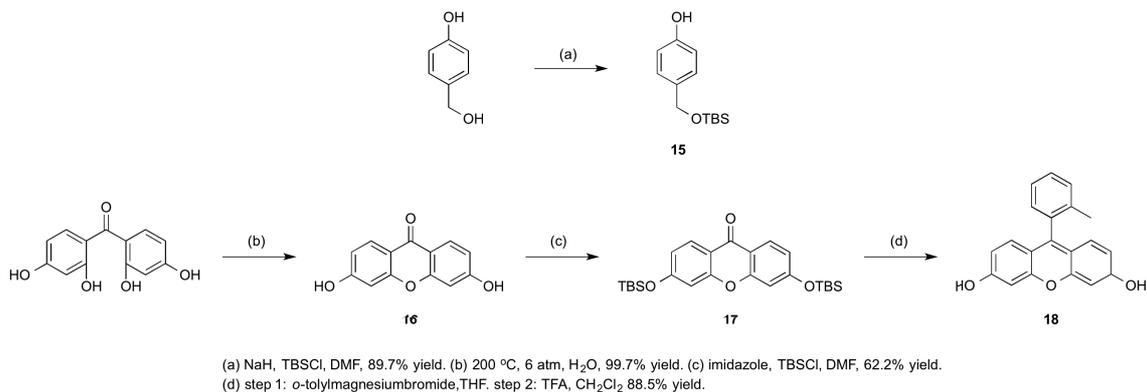
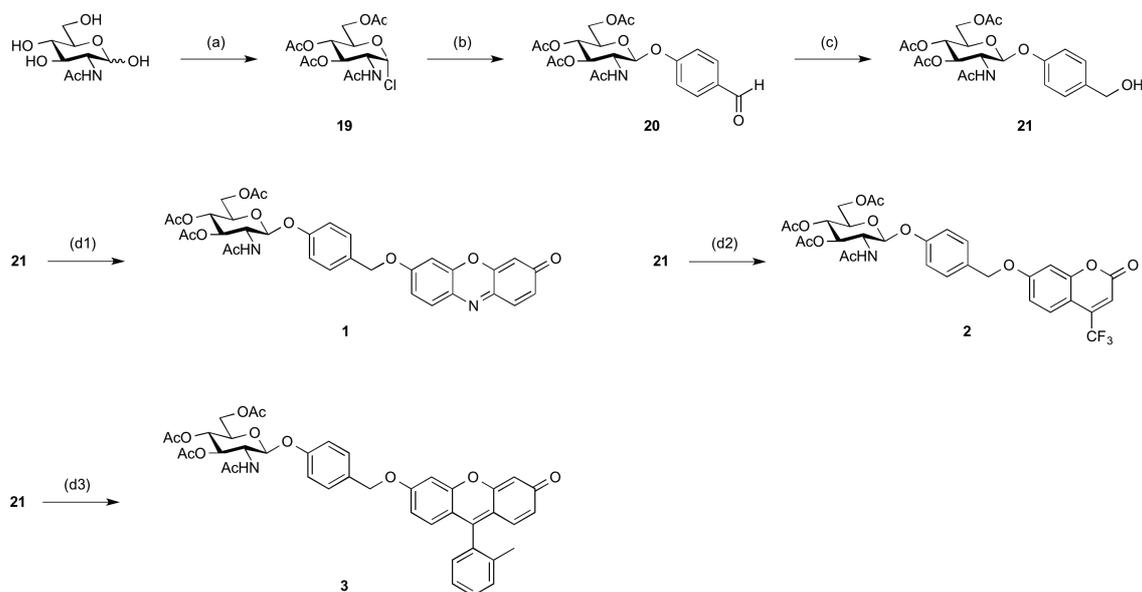


Figure 8. リンカーおよび 2MeTG の合成

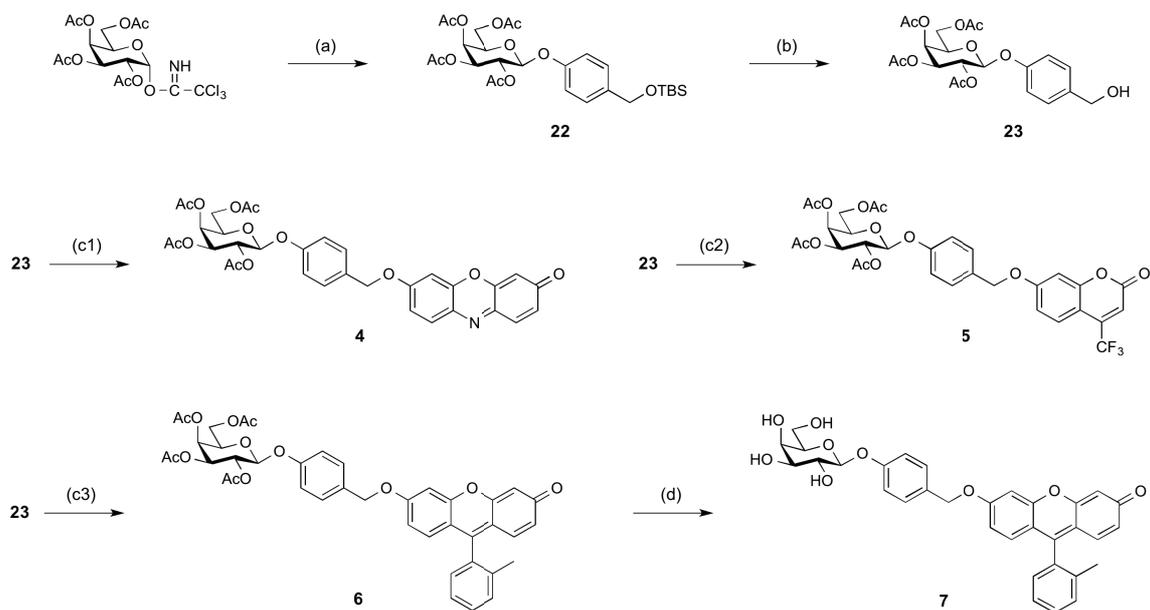
β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** は *N*-acetyl-D-glucosamine を出発原料として、水酸基をアセチル化および 1 位の水酸基部分のみマイクロ基とした化合物 **19** を得たのち [34]、 β -グリコシド結合選択的に 4-hydroxybenzaldehyde を導入し化合物 **20** を得た [35]。続いて化合物 **20** のアルデヒド基を還元することで水酸基とし、光延反応で赤色蛍光団である resorufin、青色蛍光団である TFMU および緑色蛍光団である 2MeTG を導入し [29, 30]、蛍光基質 **1-3** を得た (Figure 9)。



(a) AcCl, 69.1% yield. (b) 4-hydroxybenzaldehyde, tetrabutylammonium hydrogen sulfate, CH_2Cl_2 , 87.1% yield. (c) NaBH_4 , MeOH, 55.0% yield. (d1) ADDP, TBP, resorufin, THF, 62.9% yield. (d2) ADDP, TBP, TFMU, THF, 83.2% yield. (d3) ADDP, TBP, 2MeTG, THF, 93.2% yield.

Figure 9. β -N-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** の合成

β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** は 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl 2,2,2-trichloroacetimidate を出発原料として、 β -グリコシド結合選択的に化合物 **15** を導入し、化合物 **22** を得た。続いて化合物 **22** の TBS 基を脱保護することで化合物 **23** を得たのち、光延反応で resorufin、TFMU および 2MeTG を導入し [29, 30]、蛍光基質 **4-6** を得た。さらに、蛍光基質 **6** についてアセチル基を脱保護し、水酸基とした蛍光基質 **7** を得た (Figure 10)。



(a) **15**, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 . (b) DOWEX50W-X8 H⁺form, MeOH, 71.7% yield. (c1) ADDP, TBP, resorufin, THF, 54.3% yield. (c2) ADDP, TBP, TFMU, THF, 56.7% yield (c3) ADDP, TBP, 2MeTG, THF, 46.4% yield. (d) CH_3ONa , MeOH, 62.6% yield.

Figure 10. β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** の合成

α -L-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** は L-fucose を出発原料として、すべての水酸基をアセチル化した化合物 **24** を得たのち、1位のアセチル基部分のみを選択的に脱保護した化合物 **25**、1位の水酸基部分に対して位置選択的にトリクロロアセトイミデート基を導入した化合物 **26** を得た。続いて、化合物 **26** に対して化合物 **15** を α -グリコシド結合で導入した化合物 **27** を得た。次に化合物 **27** の TBS 基を脱保護することで化合物 **28** を得たのち、光延反応で resorufin、TFMU および 2MeTG を導入し [29, 30]、蛍光基質 **8-10** を得た。さらに、蛍光基質 **8-10** についてアセチル基を脱保護し、水酸基とした蛍光基質 **11-13** を得た (Figure 11)。

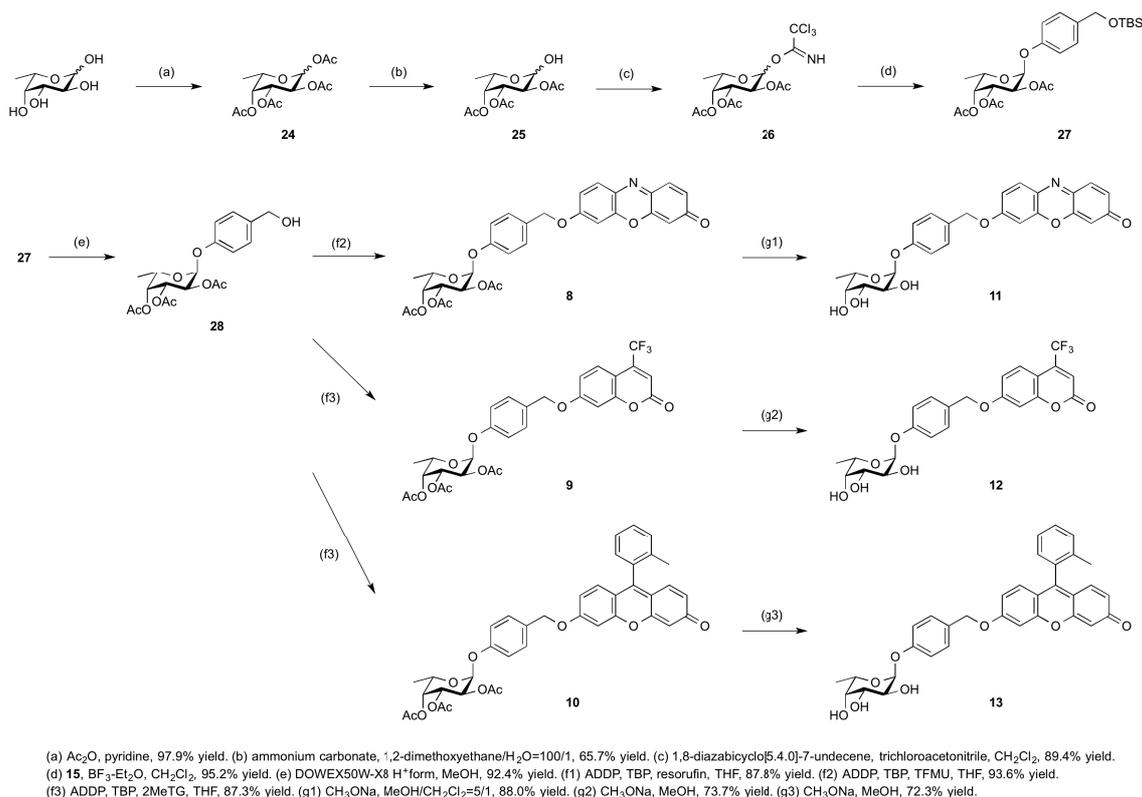


Figure 11. α -L-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** の合成

また、合成したすべての化合物について、質量分析（イオン化法：ESI および DUIS）、¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMQC によって目的の構造であること、また元素分析によって高純度に精製されていることを確認した。

さらに、細胞内で仮定した糖質加水分解酵素を探索するためには、これら酵素による加水分解反応後にだけ蛍光を発する蛍光基質でなければならない。そこで、蛍光基質 **1-13** については各種蛍光色素の励起波長照射条件下での蛍光スペクトルを測定し、蛍光基質が各種蛍光色素の励起条件下でもほぼ消光していることを確認した。

2-1-3. ヒト細胞を用いた標的酵素の探索および染色部位の同定

仮定した 3 種類の糖質加水分解酵素についてヒト細胞に普遍的に存在するか

を明らかにするため、開発した 3 種類の蛍光基質を 3 種類のヒト培養細胞 (HT1080: 線維芽肉腫細胞、HeLa: 子宮頸部癌細胞、SK-N-SH: 神経芽細胞種) へそれぞれ投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて仮定した糖鎖修飾に関与する酵素の探索を行った。なお、本研究では簡便に蛍光観察を行うため、観察用プレートに固定することが可能な接着細胞である HT1080、HeLa、SK-N-SH を使用して酵素の探索を試みた。

これまでの研究により、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性はサイトゾルおよびリソソームに存在することが報告されている [36, 37]。したがって、蛍光基質 **1-3** によりサイトゾルまたはリソソーム以外のオルガネラが染色されていれば新規な β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を蛍光イメージングしたことになる。そこで、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** を 3 種のヒト培養細胞に作用させ、染色部位を確認した結果、すべての細胞種で核周辺を染色していた (Figure 12A)。また、蛍光基質 **1** と市販のリソソーム特異的蛍光染色剤である Lyso-ID Green との共染色を行い、染色部位を比較した (Figure 12B)。その結果、染色部位が完全に一致した。さらに、リソソーム内の pH を上昇させることでリソソームの機能を抑制および肥大化をもたらす化合物として chloroquine が報告されていることから [38]、本化合物を用いた生化学的手法により染色部位の同定を試みた。Chloroquine で処理したヒト細胞に蛍光基質 **3** を投与し、染色部位の肥大化を確認した。その結果、chloroquine の投与により染色部位の肥大化が確認された (Figure 12C)。以上の結果より、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** は、リソソームを染色していることが明らかとなった。

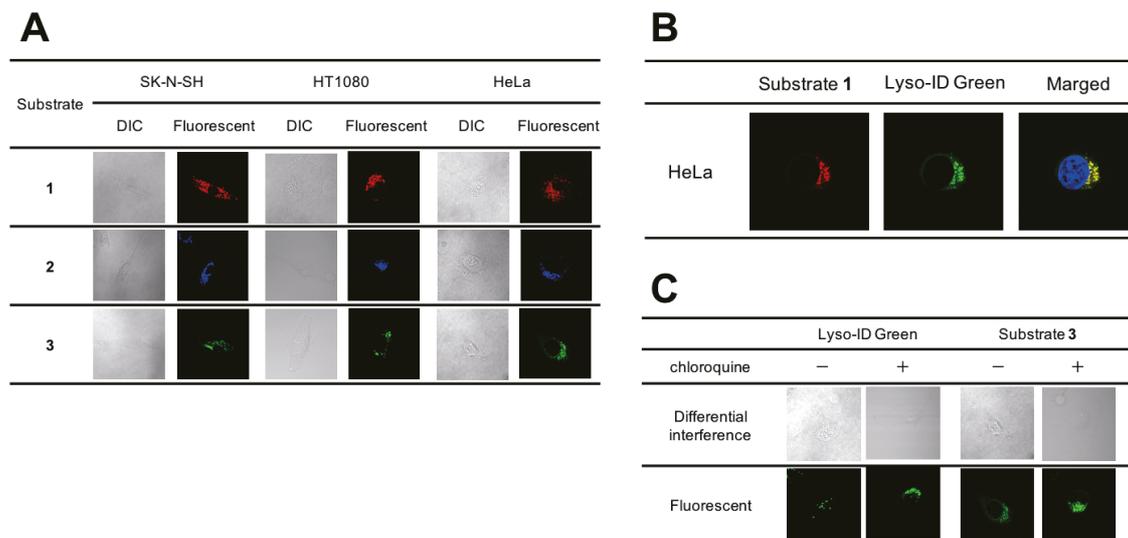


Figure 12. 蛍光基質 1-3 による染色部位および染色部位の同定 (A) 蛍光基質による染色画像 (B) 蛍光基質 1 および Lyso-ID Green による共染色画像 (青色: ヘクストによる核染色) (C) Chloroquine を用いた Lyso-ID Green および蛍光基質 1 による染色部位の肥大化

次に開発した β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質である蛍光基質 4-7 をヒト細胞に投与し、染色部位の観察を試みた。その結果、すべての細胞種でゴルジ体と思われる核周辺を染色していた (Figure 13A)。ヒト細胞において、 β -ガラクトシダーゼはリソソームのみに局在し、不要となった糖鎖または糖脂質を分解する役割を担っていることが報告されている [39-41]。ゆえに、蛍光基質 4-7 によりゴルジ体が染色されていれば、仮定した酵素であるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性が存在することとなる。そこで、蛍光基質 4 と市販のゴルジ体特異的蛍光染色剤である Golgi-ID Green との共染色および蛍光基質 6 とゴルジ体を特異的蛍光染色可能な試薬である BODIPY TR ceramide との共染色を行い、染色部位を比較した結果、両共染色において染色部位がほぼ一致した (Figure 13B)。また、市販のゴルジ体特異的染色剤では多少ながら小胞体も染色されてしまうことから、別の手法を用いて再度染色部位の同定を試みた。これまでの研究から、Brefeldin A は小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を選択的阻害することでゴルジ体を分散させることが可能な化合物として報告されている [42, 43]。

そこで、Brefeldin A を用いて染色部位が分散するかを確認した。ヒト細胞に蛍光基質 6 および Brefeldin A を投与し、染色部位の分散を確認した結果、Brefeldin A の投与により蛍光基質 6 によって染色された染色部位の分散が確認された (Figure 13C)。ゴルジ体特異的染色剤と蛍光基質との共染色および Brefeldin A を用いた染色部位分散の結果より、 β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 4-7 は、ゴルジ体を染色していた。

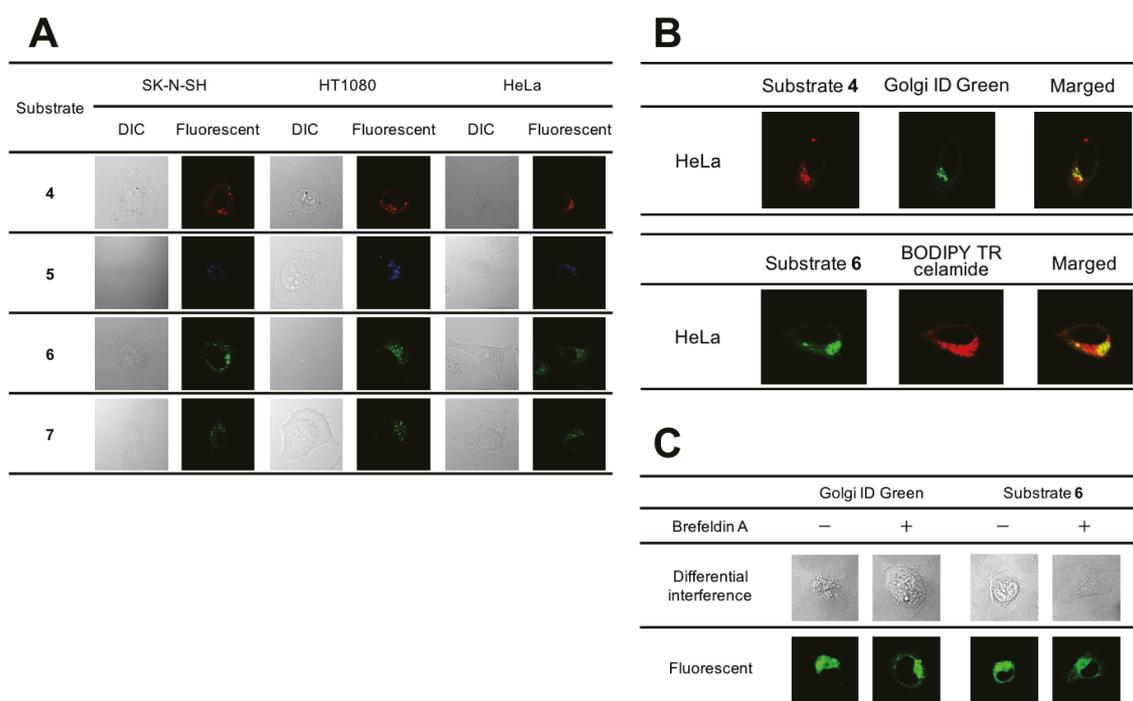


Figure 13. 蛍光基質 4-7 による染色部位および染色部位の同定 (A) 蛍光基質による染色画像 (B) 蛍光基質 4 および Golgi-ID Green または BODIPY TR celamide による共染色画像 (C) Brefeldin A を用いた Golgi-ID Green および蛍光基質 6 による染色部位の分散

最後に、開発した α -L-フコシダーゼのための蛍光基質 8-13 を 3 種のヒト培養細胞に作用させ、染色部位を確認した。その結果、蛍光色素および水酸基をアセチル化に関係なく、すべての蛍光基質およびすべての細胞種で同一の染色部位が得られ、これら染色部位はリソソームであることが考えられた (Figure 13A)。

このことから、蛍光基質 **8** または **11** と市販のリソソーム特異的蛍光染色剤である Lyso-ID Green との共染色を行い、染色部位の同定を試みた。その結果、蛍光基質 **8** または **11** と Lyso-ID Green の染色部位が完全に一致した (Figure 14B)。さらに、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼのため蛍光基質 **1-3** による染色部位の同定でも用いた chloroquine により染色部位の同定を試みた。Chloroquine で処理したヒト細胞に蛍光基質 **8** または **11** を投与し、染色部位の肥大化を確認した結果、chloroquine の投与により染色部位の肥大化が確認された (Figure 14C)。これまでの研究から、 α -L-フコシダーゼはヒト細胞において、*FUCA1* 遺伝子から生合成されるリソソーム局在の α -L-フコシダーゼおよび *FUCA2* 遺伝子から生合成される分泌型の α -L-フコシダーゼが報告されている [44, 45]。したがって、蛍光基質 **8-13** によってゴルジ体が染色されれば新規酵素活性の発見となるが、リソソーム特異的染色剤と蛍光基質との共染色および chloroquine を用いた染色部位肥大化の結果より、開発した α -L-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** はリソソームを染色していた。

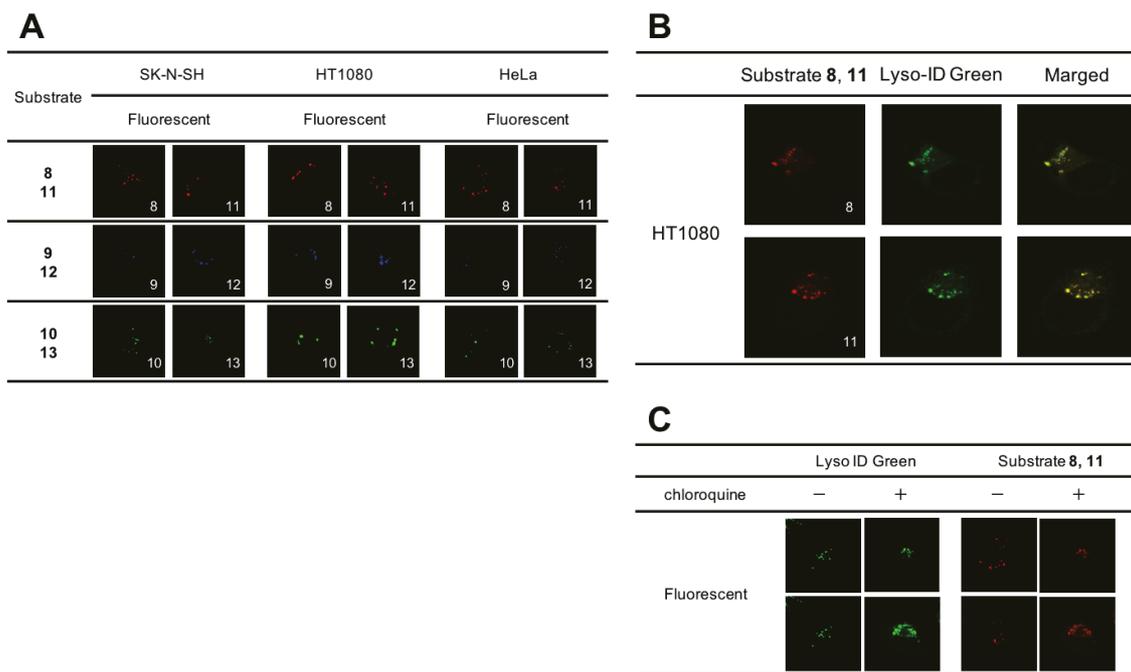


Figure 14. 蛍光基質 **8-13** による染色部位および染色部位の同定 (A) 蛍光基質による染色画像 (B) 蛍光基質 **8, 11** および Lyso-ID Green による共染色画像 (C) Chloroquine を用いた Lyso-ID Green および蛍光基質 **8, 11** による染色部位の肥大化

以上の結果から、ゴルジ体には β -ガラクトシダーゼが存在するという報告がこれまでにないことから、蛍光基質 **4-7** により生細胞内で蛍光イメージングされたゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は新規酵素活性であり、本酵素活性は糖鎖修飾に関与する加水分解酵素の特徴である **Subsite -1** および **Subsite +1** を持つ *exo* 型の新規 β -ガラクトシダーゼに由来することが示された。

また、ゴルジ体には糖鎖修飾に関与する加水分解酵素の特徴である **Subsite -1** および **Subsite +1** を持つ *exo* 型の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼまたは α -*L*-フコシダーゼに由来する酵素活性は見られなかった。しかしながら、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** および α -*L*-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** はヒト細胞内でリソソームを染色したことから、蛍光基質 **1-3** はリソソームに局在する β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼを、蛍光基質 **8-13** はリソソームに局在する α -*L*-フコシダーゼを蛍光イメージング可能な蛍光基質であ

り、これら酵素活性を生細胞内で蛍光イメージング可能な蛍光基質を開発することに成功した。

2-2. セルベースアッセイによるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

これまでの研究により、ヒト細胞唯一の β -ガラクトシダーゼ遺伝子として *GLB1* が同定されており、本遺伝子から 2 種類の β -ガラクトシダーゼ isoform が生合成されることが知られている [39-41, 46-48]。1 つ目の isoform は、リソソームに局在する *GLB1 isoform 1* (Lyso-*GLB1 iso1*) である。*GLB1* 遺伝子から生合成された完全長前駆体 β -ガラクトシダーゼ (fp*GLB1*) は小胞体に輸送され、シグナルペプチドである N 末端側の 1-28 のアミノ酸残基が分解を受け、前駆体 β -ガラクトシダーゼ (p*GLB1*) となる [46-48]。その後、p*GLB1* はゴルジ体に輸送され、ゴルジ体において C 末端側の 530 - 677 のアミノ酸残基が分解を受け、ゴルジ体局在 *GLB1 isoform 1* (Golgi-*GLB1 iso1*) となったのち、リソソームへと輸送され成熟型の Lyso-*GLB1 iso1* となる [46-48]。2 つ目は、*GLB1* 遺伝子から選択的スプライシングにより生合成される核周辺に局在する *GLB1 isoform 2* である [46-48]。つまり、ヒト細胞内には小胞体に局在する fp*GLB1*、小胞体およびゴルジ体に局在する p*GLB1*、ゴルジ体に局在する Golgi-*GLB1 iso1*、リソソームに局在する Lyso-*GLB1 iso1*、核周辺に局在する *GLB1 isoform 2* の 5 種類の β -ガラクトシダーゼが存在する。また、この 5 種類の *GLB1* の中でも、Lyso-*GLB1 iso1* の前駆体タンパク質は *in vitro* で加水分解活性を持つという報告はあり、細胞内での機能は不明である [49]。さらに、*GLB1 isoform 2* は触媒アミノ酸残基と想定される 188 番目のグルタミン酸が欠損しており、酵素活性を持たないことが報告されている [47, 48, 50]。

そこで、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼは Lyso-*GLB1 iso1* の前駆体タンパク質のいずれかに由来すると考え、fp*GLB1* および p*GLB1* 特異的アミノ酸

配列を抗原として作成された anti-GLB1 抗体および蛍光基質 **6** の共染色によりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定を試みた。

2-2-1. 免疫染色法によるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

Lyso-GLB1 iso1 と同一のアミノ酸配列である Golgi-GLB1 iso1 は、pGLB1 がゴルジ体でタンパク質 C 末端側の 530–677 番目までのアミノ酸配列がプロセッシングを受けることで生合成される。したがって、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性による染色部位と fpGLB1 および pGLB1 特異的アミノ酸配列である C 末端側の 530–677 番目までのアミノ酸配列を抗原として作成された抗体は fpGLB1 および pGLB1 特異的抗体となる。市販の anti-GLB1 抗体を検索すると、531 – 545 番目までのアミノ酸配列を抗原として作成された anti-GLB1 抗体が Sigma 社のみから市販されていた。それゆえ、本抗体を用いた免疫染色による染色部位および β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** の染色部位を比較することで、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼが Lyso-GLB1 iso1 の前駆体タンパク質である fpGLB1 または pGLB1 に由来するかを確認することが可能となる。

そこで、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼが fpGLB1 または pGLB1 に由来するかを免疫染色法によって明らかとするため、蛍光基質 **6** を HeLa 細胞へ投与後、531 – 545 番目までのアミノ酸配列を抗原として作成された anti-GLB1 in rabbit 抗体を一次抗体、anti-rabbit IgG-linked CF568 抗体を二次抗体として免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて染色部位の観察を行った。その結果、蛍光基質 **6** による染色部位と免疫染色による染色部位が一致した (Figure 15)。この結果から、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は fpGLB1 または pGLB1 に由来することが示唆された。

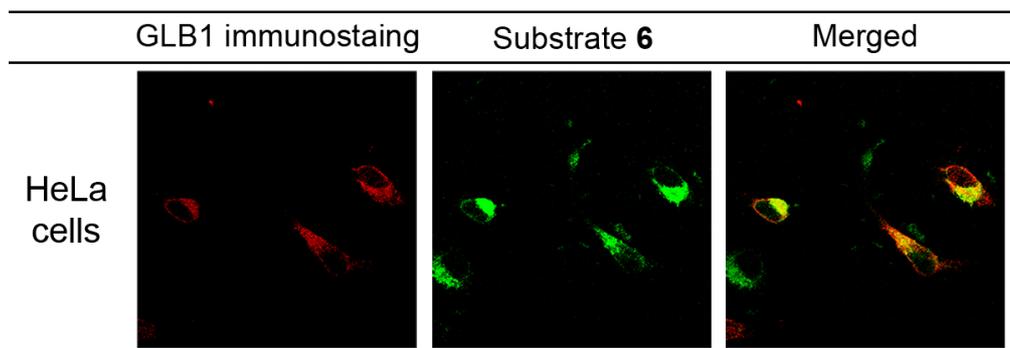


Figure 15. Anti-GLB1 抗体および蛍光基質 6 による共染色画像

2-2-2. 蛍光イメージング法によるゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

これまでの研究から、D-ガラクトースに β -結合で直接蛍光色素を結合された蛍光基質である 5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C_{12} FDG, Figure 16A) は Lyso-GLB1 iso1 の基質となることが知られている [51]。それゆえ、 C_{12} FDG の類似化合物である TokyoGreen β -galactopyranoside [33, 52] (TG β -gal, Figure 16B) も Lyso-GLB1 iso1 の基質となると考えられる。そこで、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼが Lyso-GLB1 iso1 に由来するかを明らかにするため、蛍光基質 4 および TG β -gal を HeLa 細胞へ投与後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて染色部位の比較を行った。その結果、染色部位は一致せず、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼは Lyso-GLB1 iso1 由来でないことが示された。

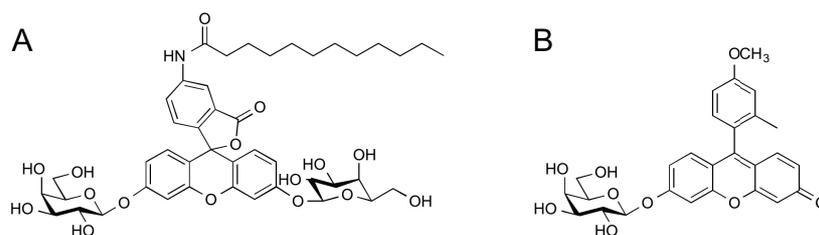


Figure 16. GLB1 isoform 1 に対する蛍光基質の構造

(A) 5-Dodecanoylamino fluorescein di-β-D-galactopyranoside (C₁₂FDG) の構造

(B) TokyoGreen β-galactopyranoside (TG β-gal) の構造

2-3. 光親和性標識法によるゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

Anti-GLB1 抗体を用いた免疫染色および蛍光基質を用いた共染色の結果より、発見したゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性は fpGLB1、pGLB1 または Golgi-GLB1 iso1 に由来する可能性に限定することができたものの、発見したゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性がこれら 3 種類の GLB1 のいずれかであるかを明らかにするには、ゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素を単離・同定する必要がある。遺伝子ノックダウンおよびノックアウトは標的とするタンパク質欠損時の表現形を容易に観察することが可能である。しかしながら、同一の遺伝子からこれら 3 種類の GLB1 は生合成されるため、遺伝子的手法を用いての単離・同定は困難である。また、発見したゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素は新規酵素であるがゆえに、本酵素に対する阻害剤は未知であり、本酵素の基質となる蛍光基質しか存在しない。さらに、本酵素の活性を保持したまま単離することは困難であり、数多くのタンパク質が存在する細胞内でも標的とするタンパク質を標識することが可能な手法が必要となる。これまでの研究から数多くのタンパク質が存在する細胞内でもタンパク質レベルで標的とするタンパク質を容易に標識可能な手法として、主に特定アミノ酸残基標識官能基を用いた手法および光親和性標識法が存在するが、特定アミノ酸残基標識を用いた手法で

は、アミノ酸残基標識に必要な官能基をタンパク質中の標的とするアミノ酸残基に接近させることができ、かつ標的酵素との親和性の強いプローブが必要となる。しかし、現時点でゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素に対する阻害剤は未知でありプローブの開発は困難である。それに対して、光親和性標識法は、標的とする酵素に認識される化合物が存在すれば、酵素との親和性に関係なく、標的酵素を標識することが可能なプローブを開発することが可能である。そこで、これら問題点をすべて解決することが可能な光親和性標識法を用いて、酵素の単離および同定を試みた。

2-3-1. 光親和性プローブの分子設計および合成

光親和性標識法により酵素を単離・同定するためには、標的とする酵素に特異的に認識される光親和性プローブ（リガンド）が必要となることから、蛍光基質の構造に基づいて **Subsite +1** に適合するように β -ガラクトシド骨格、**Subsite -1** に適合するようにフェニル基を標的とする酵素によって加水分解されないように β -チオグリコシド結合で結合させ、光反応性基である **benzophenone**、光親和性標識後にラベル化官能基を導入するための三重結合を有する分子設計とした（Figure 17）。

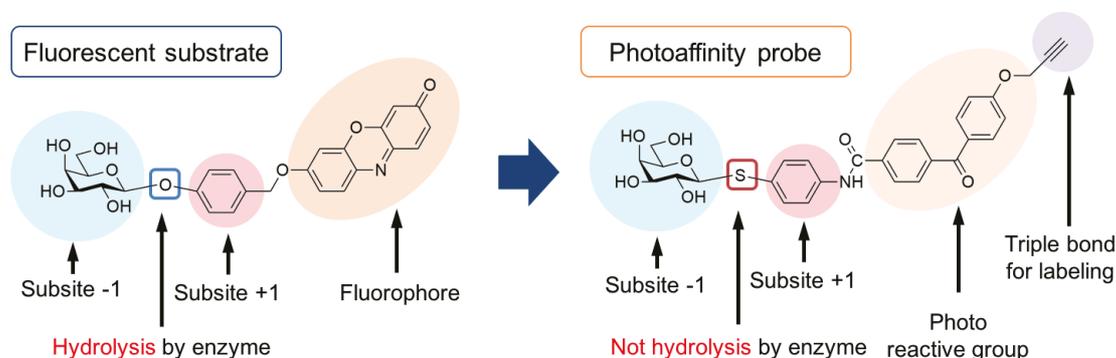
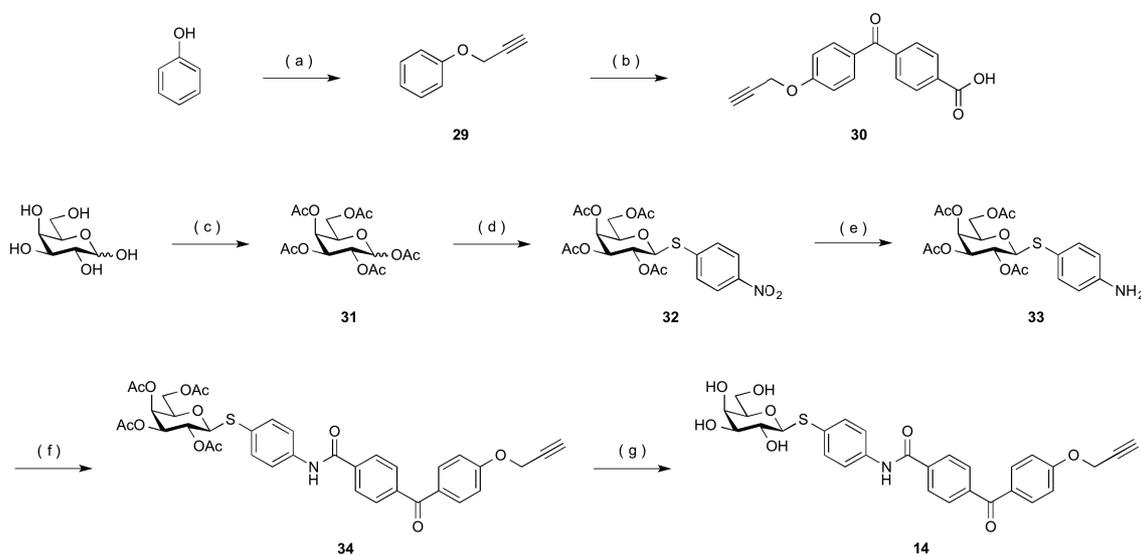


Figure 17. 蛍光基質の構造に基づいた光親和性プローブの分子設計

次に、設計した光親和性プローブについて有機合成化学的手法によって合成した。三重結合を有する光反応性基である benzophenone は市販されていないため、phenol を出発原料として、propargylbromide によって三重結合を導入した化合物 **29** を得た。さらに、化合物 **29** に対して Friedel-Crafts 反応によって terephthaloylchloride を導入した化合物 **30** を得た [53] (Figure 18)。

光親和性プローブは、各単糖を出発原料として、フェニル基を導入したのち、三重結合を有する光反応性基を導入する戦略で合成することとした。D-galactose を出発原料として、すべての水酸基をアセチル化した化合物 **31** を得たのち、化合物 **31** に対して 4-nitrothiophenol を β -グリコシド結合で導入した化合物 **32** を得た。続いて、化合物 **32** のニトロ基を接触還元によってアミノ基とした化合物 **33** を得た。次に得られた化合物 **33** および化合物 **30** をアミド結合で結合させ、アセチル化光親和性プローブ **34** としたのち、すべてのアセチル基を脱保護することで光親和性プローブ **14** を得た (Figure 18)。



(a) K_2CO_3 , propargylbromide, acetone, 95.2% yield. (b) $AlCl_3$, terephthaloylchloride, CH_2Cl_2 , 66.6% yield. (c) Ac_2O , pyridine, 98.0% yield. (d) 4-nitrothiophenol, $BF_3 \cdot Et_2O$, $CHCl_3$, 34.0% yield. (e) $Pd(OH)_2/C$, EtOH, 64.0% yield. (f) **30**, HOObt, DCC, THF, 75.0% yield. (g) triethylamine, H_2O , MeOH, 75.0% yield

Figure 18. 光反応性基および光親和性プローブの合成

2-3-2. 光親和性標識法による新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の単離および同定

開発した光親和性プローブ **14** および **34** を用いてプルダウンアッセイによりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の単離を試みた。光親和性プローブ **14** または **34** をヒト細胞へ投与し、365 nm の UV を照射することで光親和性プローブ **14**, **34** と本光親和性プローブを認識したタンパク質を細胞内でクロスリンクさせた。続いてヒト細胞を可溶化したのち、Huisgen 環化付加反応により光親和性プローブ **14**, **34** に含まれる三重結合に対して特異的にアジド化ビオチンを導入することで、光標識タンパク質をビオチン標識した。得られた光標識およびビオチン標識タンパク質に対して streptavidin ビーズを用いてアフィニティー精製および SDS-PAGE にて低分子を除去することでタンパク質を精製した。精製後サンプルについて、銀染色により単離したタンパク質、streptavidin-HRP conjugate を用いたウエスタンブロットによりビオチン標識されたタンパク質、anti-GLB1 抗体を用いたウエスタンブロットにより GLB1 を確認した。その結果、銀染色により 60 kDa 付近に単離したいくつかのタンパク質、streptavidin-HRP conjugate を用いたウエスタンブロットにより 63 kDa または 48 kDa 付近にビオチン標識されたタンパク質、anti-GLB1 抗体を用いたウエスタンブロットにより 63 kDa 付近に GLB1 由来のタンパク質が存在することが示された (Figure 19)。

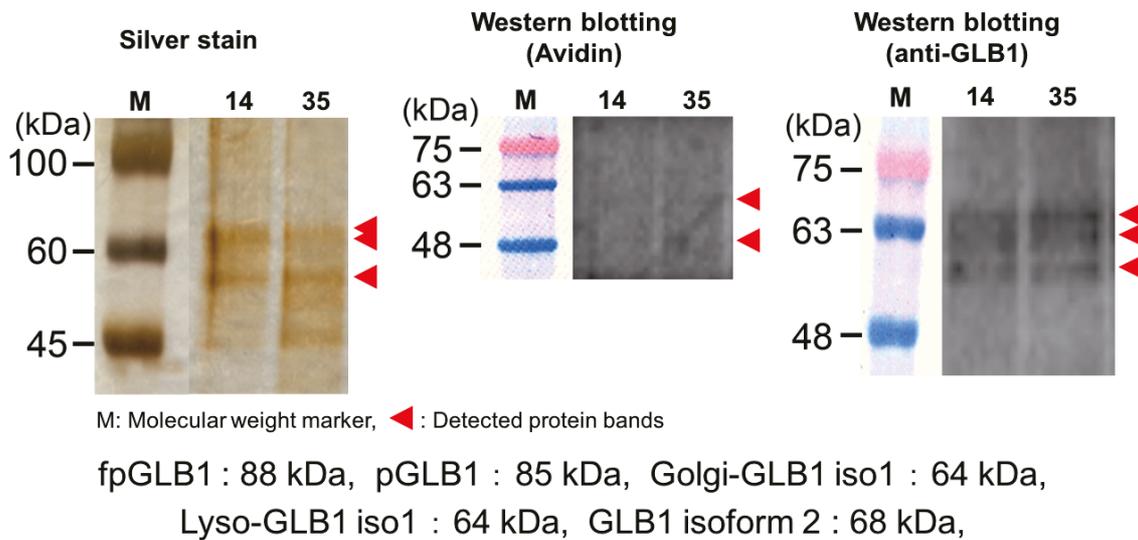
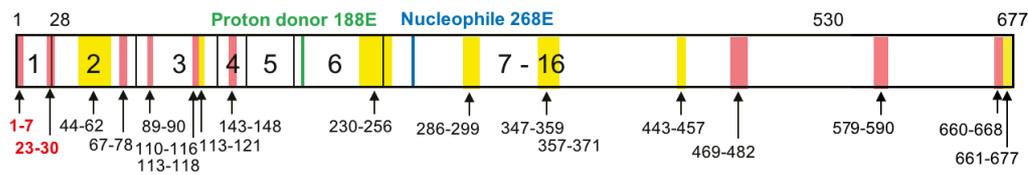


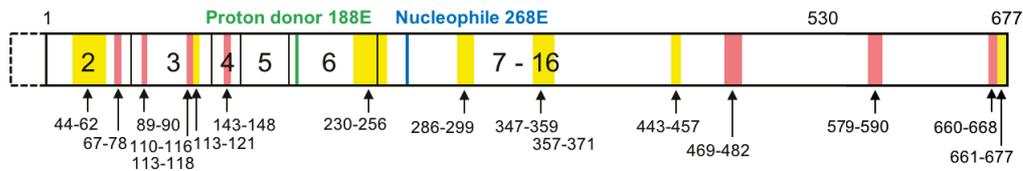
Figure 19. 精製後サンプルの銀染色およびウエスタンブロット解析

次に精製したタンパク質をトシプシンによってペプチド断片とし、LC-MS/MSによりこれらタンパク質由来のペプチド断片を測定した。同定されたペプチド断片について Uniprot データベースを用いてデータベース検索を行い、タンパク質の同定を試みた。その結果、ヒト細胞内で報告のある唯一の β -ガラクトシダーゼである GLB1 が検出された。そこで、検出されたペプチド断片を確認すると、fpGLB1 のみに存在するアミノ酸配列である 1-7 番目および 23-30 番目のアミノ酸配列が高い信頼性で検出されが、fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のすべてに共通するアミノ酸配列も高い信頼性で検出されており、3 種類のいずれがゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素であることを明らかにすることはできなかった。しかしながら、ペプチドマス解析の結果、比較的高いアミノ酸シーケンスカバレッジでそれぞれの GLB1 が同定されており、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素は GLB1 由来のタンパク質であることが示唆された。

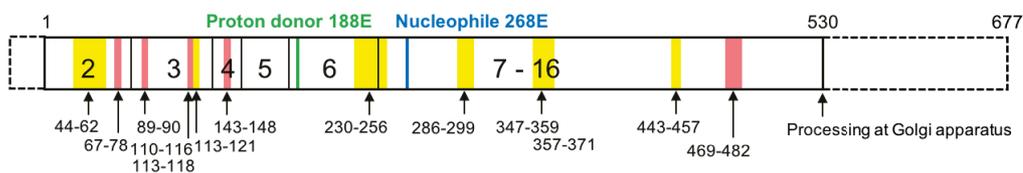
fpGLB1 at ER : Protein coverage 33.3%



pGLB1 at ER and Golgi apparatus : Protein coverage 31.9%



Golgi-GLB1 iso1 at Golgi apparatus, Lyso-GLB1 iso1 at Lysosome : Protein coverage 33.7%



GLB1 isoform 2 at perinuclear region: Protein coverage 33.7%

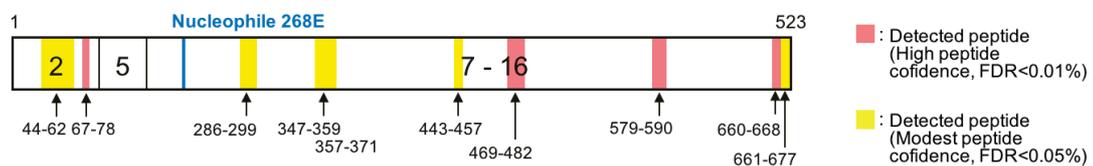


Figure 20. LC-MS/MS を用いた光標識タンパク質の同定

2-4. ゴルジ体局在 GLB1 のケミカルノックダウンによる細胞内機能の解明を目指した特異的阻害剤の探索

ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素は GLB1 由来のタンパク質であることが明らかとなったものの、本酵素の細胞内における機能は不明であり、細胞内機能を明らかとする必要がある。しかしながら、すべての GLB1 は同一の遺伝子である *GLB1* gene から転写・翻訳を経て生合成されるため、遺伝子ノックダウンおよびノックアウトにより特定の GLB1 の機能だけを特異的に欠損さ

せることは不可能である。そこで、*GLB1* gene から生合成されるすべての *GLB1* 由来タンパク質に影響を与えることがなく、タンパク質レベルで特定の *GLB1* 由来タンパク質の機能だけをノックダウンすることが可能なケミカルノックダウン法を用いてゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ *GLB1* の細胞内機能の解明を試みた。

2-4-1. ゴルジ体局在 *GLB1* 特異的阻害剤探索のためのアッセイ系の構築

ケミカルノックダウン法によりゴルジ体局在 *GLB1* の細胞内機能を明らかにするためには、細胞内で本 *GLB1* を特異的に阻害可能な阻害剤およびこれら阻害剤を探索可能なアッセイ系が必要となる。しかしながら、これらアッセイ系およびゴルジ体 *GLB1* 活性のみを可視化することが可能な蛍光基質も市販されておらず、かつゴルジ体 *GLB1* の活性を有したまま単離することも困難である。

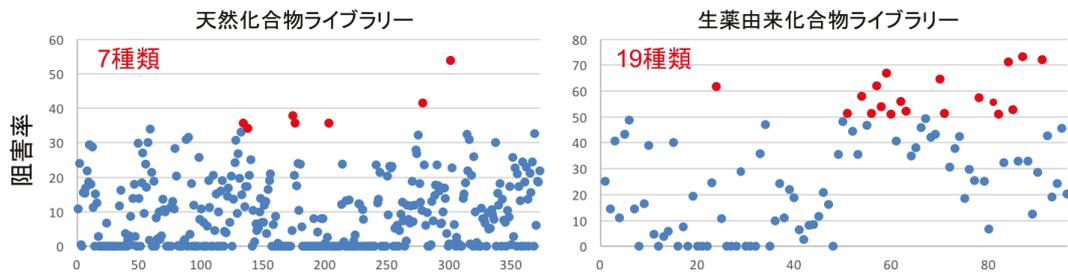
そこで、これまでに開発した蛍光基質 **4-7** はゴルジ体 *GLB1* の活性を細胞内で可視化することが可能であることから、これら蛍光基質を用いてゴルジ体 *GLB1* 特異的阻害剤探索のためのアッセイ系の構築を試みた。数多くの化合物からハイスループットに阻害剤を探索するため、蛍光測定可能な 96 穴プレートに HeLa 細胞を 24 時間培養したのち、ヒト細胞に影響を与えない蛍光基質濃度である終濃度 11.5 μM の蛍光基質 **6** および阻害剤候補化合物を含む抗生物質不含 DMEM を加え、阻害剤候補化合物がゴルジ体に到達し、ゴルジ体 *GLB1* 活性を阻害するまでに必要と考えられる時間である 24 時間後の蛍光強度を測定することでゴルジ体 *GLB1* 阻害活性を評価可能な阻害剤探索系を構築した。

2-4-2. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 *GLB1* 特異的阻害剤の探索

ゴルジ体 *GLB1* 阻害活性を評価可能な阻害剤探索系を構築できたため、続い

て本探索系を用いて公的化合物ライブラリからゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索を試みた。ケミカルノックダウン法を用いてゴルジ体 GLB1 の細胞内機能の解明を行うためには、阻害剤としてこれまでに知られている Lyso-GLB1 iso1 活性に対しても阻害活性を有する糖類似体阻害剤ではなく、非糖類似体のゴルジ体 GLB1 のみに対して特異的に阻害活性を有する阻害剤が必要となる。そこで、数多くある公的化合物ライブラリの中でも、微生物の二次代謝産物などの多様な分子骨格を有する化合物から構成される天然化合物ライブラリである NPDepo ライブラリ（理化学研究所環境資源科学研究センター）および生薬由来化合物ライブラリ（富山大学和漢医薬学総合研究所）からゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索を試みた。その結果、化合物濃度を固定した一次スクリーニングにより NPDepo ライブラリより 7 種類、生薬由来化合物ライブラリより 19 種類の阻害剤を発見した。さらに、化合物濃度を割り振った二次スクリーニングにより NPDepo ライブラリより 2 種類、生薬由来化合物ライブラリより 3 種類の濃度依存的に作用している阻害剤を発見した（Figure 21）。この結果から、二次スクリーニングにより発見した 5 種類の化合物は細胞毒性などの影響ではなく、ゴルジ体 GLB1 の活性を特異的に阻害していることが示唆された。

1次スクリーニング(基質濃度: 12 μ M、化合物濃度:天然化合物 1 μ g/well、生薬化合物 10 μ M)



2次スクリーニング(基質濃度: 12 μ M、化合物濃度:天然化合物 1-0.25 μ g/well、生薬化合物 10-0.1 μ M)

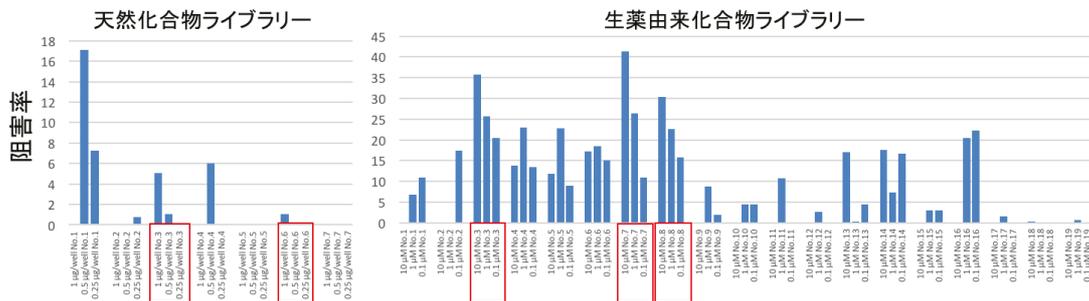


Figure 21. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 GLB1 阻害剤探索結果

しかしながら、これら 5 種類の化合物は Lyso-GLB1 iso1 にも阻害活性を示す可能性がある。そこで、今後は発見した阻害剤が Lyso-GLB1 iso1 の酵素活性も阻害するかを確認するため、蛍光基質 **6** を用いて発見したゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤について、Lyso-GLB1 iso1 に対する基質である TG β -gal を用いて Lyso-GLB1 iso1 に対する阻害活性を確認する予定である。

第3章 結論

3-1. 総括

本研究では、既知の *N*-結合型糖鎖修飾過程から、2つの仮説を設定した。1つ目は、ゴルジ体においても小胞体に存在するような不良糖鎖修飾の修復を担う逆行の糖鎖修飾に関与するグリコシダーゼが存在すると仮定した。2つ目は、*N*-結合型糖鎖修飾過程における糖鎖末端の結合様式と続いて起こる修飾反応の形式から、ゴルジ体において、糖鎖発現量の調整を担う β -グリコシダーゼが存在し、糖鎖末端が β -結合のときも本 β -グリコシダーゼによる加水分解反応によって糖鎖修飾が生じると仮定した。既知の *N*-結合型糖鎖修飾過程において2つの仮説から、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 α -シアリダーゼの4種類の酵素を仮定した。仮定したこれら酵素によりヒト細胞ゴルジ体における不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調整機構の解明が可能となる。

そこで、仮定したこれら酵素の発見と糖鎖修飾における役割の解明を目指して、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素を蛍光イメージング可能な蛍光基質プラットフォームの開発を第一の研究目的とした。本蛍光基質プラットフォームを開発するため、まず既知の糖鎖修飾に関与する加水分解酵素の活性部位について *in silico* 解析を行った。その結果、糖鎖修飾に関与する加水分解酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示された。そこで、これら解析結果に基づいて糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の立体構造を考慮した蛍光基質を設計し、設計した蛍光基質が糖鎖修飾に関与する加水分解酵素に天然基質と同様に適合することを *in silico* 解析で明らかとした。本結果により糖鎖修飾に関与する新規酵素の探索および糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の蛍光イメージングのための蛍光基質を開発することが可能となった。

次に、仮定した糖質加水分解酵素に対する蛍光基質の合成を行った。 β -*N*-アセ

チルグルコサミニダーゼのための蛍光基質（蛍光基質 **1-3**）は全 4 工程、赤色蛍光基質 21%、青色蛍光基質 28%、緑色蛍光基質 31 %の収率で合成した。 β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質（蛍光基質 **4-7**）は全 4 工程、赤色蛍光基質 39%、青色蛍光基質 41%、緑色蛍光基質 21 - 33 %の収率で合成した。 α -L-フコシダーゼのための蛍光基質（蛍光基質 **8-13**）は全 7 工程、赤色蛍光基質 39-44%、青色蛍光基質 35 - 47%、緑色蛍光基質 32 - 44 %の収率で合成した。これら蛍光基質について MS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、HMQC によって目的の構造であること、元素分析によって高純度で精製されていることを確認した。さらに、これら蛍光基質について各種蛍光色素の励起波長照射条件下での蛍光スペクトルを測定し、蛍光基質が各種蛍光色素の励起条件下でもほぼ消光していることも確認した。このことにより、糖鎖修飾に関与する蛍光基質プラットフォームを用いて開発し蛍光基質 **1-13** は、標的とする酵素活性を蛍光イメージング可能であることが示された。

第二の研究目的として、仮定した 4 種類の糖質加水分解酵素活性の中でもゴルジ体 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ、ゴルジ体 α -L-フコシダーゼのヒト細胞内での探索および同定を行った。仮定した 3 種類の酵素について、開発した蛍光基質を用いたヒト細胞内蛍光イメージングにより探索を行った。その結果、蛍光基質 **4-7** により仮定したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見した。発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調整機構を担う逆行の糖鎖修飾酵素であることが期待され、ヒト細胞内糖鎖修飾過程では、trans ゴルジ体において β -ガラクトース残基がガラクトシルトランスフェラーゼによりタンパク質糖鎖末端に糖転移される [7] ことから、開発した β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** が trans ゴルジ体を染色しているかを今後確認する必要がある。

また、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼまたは α -L-フコシダーゼについては、仮定した酵素活性はゴルジ体に見られなかったが、蛍光基質 **1-3** および蛍光基質 **8-13** はヒト細胞内でリソソームを染色しており、蛍光基質 **1-3** によりリソソーム β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性、蛍光基質 **8-13** により α -L-フコシダー

ゼ活性を生細胞内で蛍光イメージングすることに成功した。それゆえ、これら蛍光基質を用いることで β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性または α -L-フコシダーゼ活性を生細胞内蛍光イメージングすることが初めて可能となった。

また、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素を明らかとするため、蛍光免疫染色および市販蛍光基質との共染色による細胞アッセイによって酵素の同定を試みた。その結果、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性はヒト細胞唯一の β -ガラクトシダーゼ遺伝子である *GLB1 gene* から生合成される fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のいずれかであることが示唆された。さらに、光親和性標識法によりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の単離・同定を試み、本活性が fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のうちのどの酵素に由来するかを確認した。光親和性標識に必要な光親和性プローブは蛍光基質の構造に基づいて、全 5 工程、12%の収率で合成したのち、開発した光親和性プローブをヒト細胞である HeLa 細胞に投与し、プルダウンアッセイにより酵素の単離およびペプチドマス解析により酵素の同定を試みた。その結果、ヒト細胞に存在する唯一の β -ガラクトシダーゼである GLB1 が検出され、GLB1 のうちの 1 つである fpGLB1 特異的なアミノ酸配列を含むペプチド断片も検出された。しかしながら、fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のすべてに共通するアミノ酸配列も検出され、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素が fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のいずれかであるかを明らかにすることはできなかったが、高いアミノ酸シーケンスカバレッジでそれぞれの GLB1 が同定されており、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素は GLB1 由来のタンパク質であることが示唆された。これら結果は、*in vitro* で酵素活性を有することが報告されていた GLB1 由来タンパク質が *in vivo* でも同様の β -ガラクトシダーゼを有することを示し、本ゴルジ体 GLB1 がヒト細胞のゴルジ体における糖鎖修飾過程で不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調整機構を担う酵素である可能性が示された。

第三の研究目的として、ケミカルノックダウンによりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素であるゴルジ体 GLB1 の機能を解明するため、ゴルジ体 GLB1 に対する特異的阻害剤の探索を試みた。阻害剤は、開発した蛍光基質を用い

てゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索系を構築し、これら探索系を用いて公的化合物ライブラリより阻害剤の探索を試みた。その結果、ゴルジ体 GLB1 の活性を特異的に阻害する計 5 種類の阻害剤を同定した。これら阻害剤はゴルジ体 GLB1 を細胞内で阻害可能な阻害剤であり、本阻害剤を用いたケミカルノックダウンによりゴルジ体 GLB1 活性を阻害することでゴルジ体 GLB1 の機能を解明することが可能となる。しかしながら、これら阻害剤には問題点があり、これら問題点を今後解決する必要がある。問題点として、発見した 5 種類の化合物がゴルジ体局在 GLB1 と活性部位を構成するアミノ酸配列が同一な Lyso-GLB1 iso1 にも阻害活性を示す可能性がある。このことから、Lyso-GLB1 iso1 の基質である TG β -gal を用いて Lyso-GLB1 iso1 に対する阻害活性を確認する必要がある。

また今後の課題として、本研究では新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見し、本活性がゴルジ体 GLB1 に由来することを見出したが、本酵素が細胞内でどの糖鎖を基質とするのかは不明である。そこで、細胞内に 5 種類存在する GLB1 のうちゴルジ体 GLB1 が基質とする糖鎖を明らかとする必要がある。しかしながら、ゴルジ体 GLB1 の活性を保持したまま単離することは困難であり、*in vitro* でどの糖鎖が基質であるかを調べることは困難である。それゆえ、ゴルジ体 GLB1 の活性が存在するヒト細胞内で解析を行う必要がある。そこで、ゴルジ体 GLB1 が基質とする糖鎖のために、見出したゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤を用いてゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性のみを阻害した際の細胞内糖鎖プロファイルの解析を行い、ゴルジ体 GLB1 に由来するゴルジ体 β -ガラクトシダーゼがコンプレックス型糖鎖修飾経路において Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 型糖鎖からガラクトース残基を取り除き一段階前の糖鎖修飾過程である GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 型糖鎖に戻す修飾、またはハイブリット型糖鎖修飾経路において GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂ 型糖鎖からガラクトース残基を取り除き一段階前の糖鎖修飾過程である GlcNAcMan₅GlcNAc₂ 型糖鎖に戻す修飾に関与するかを明らかにする必要がある。

本研究では、第一の目的として糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素のための蛍光基質プラットフォームを開発した。本プラットフォームは糖鎖修飾に関与す

る新規酵素の探索に利用することが可能なだけでなく、既知の糖鎖修飾酵素蛍光イメージングにも活用することが可能である。また、第二の目的として既知のヒト細胞内糖鎖修飾過程から新規糖鎖修飾酵素として、いくつかの酵素の存在を仮定し、仮定したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見した。本ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は、ヒト細胞ではこれまでに報告のない不良糖鎖修飾の修復または糖鎖発現量の調整を担う逆行の糖鎖修飾酵素であることが期待される。さらに、第三の研究目的としてゴルジ体 **GLB1** 特異的阻害剤の探索系を構築し、これら探索系を用いて公的化合物ライブラリよりゴルジ体 **GLB1** の活性を特異的に阻害する計 5 種類の阻害剤を同定した。これら阻害剤はゴルジ体 **GLB1** 活性を阻害することが可能であり、本阻害剤をもちいることでゴルジ体 **GLB1** の機能を解明することが可能となる。

最後に本研究は、これまで提唱されている *N*-結合型糖鎖修飾に対して新たな糖鎖修飾過程の存在を提唱および示唆する研究である。また、糖鎖修飾に関与する酵素はタンパク質の多様な機能発現に必要な酵素であることから、本研究で開発した糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素のための蛍光基質プラットフォームを用いることで、ヒト細胞内糖鎖修飾の役割解明に大きく寄与するだけでなく、翻訳後修飾研究の発展にも大きく寄与することが可能となる。

第4章 実験の部

(略語)

AcCl; acetyl chloride, Ac₂O; acetic anhydride, ADDP; 1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine, BF₃-Et₂O; boron trifluoride - ethyl ether complex, BSA; bovine serum albumin, DCC; *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide, DMEM; dulbecco's modified eagle medium, DMF; *N,N*'-dimethylformamide, DMSO; dimethyl sulfoxide, DUIS; electrospray and atmospheric pressure chemical simultaneous ionization, Em; emission wavelength, ESI; electrospray ionization, Et₂O; diethyl ether, EtOH; ethanol, Ex; excitation wavelength, FBS; fetal bovine serum, HOOBt; 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine, HRP; horseradish peroxidase, MeOH; methanol, PBS; phosphate buffered saline (not including Ca²⁺ and Mg²⁺), SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, TBSCl; *tert*-butyldimethylchlorosilane chloride, TBP; tributylphosphine, TFA; trifluoroacetic acid, TFMU; 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin, THF; tetrahydrofuran, THPTA; tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine, 2MeTG; 2-methyl Tokyo green

4-1. ヒト培養細胞の調製

4-1-1. DMEM の調製

DMEM は、DMEM (Sigma-Aldrich, D6046) 360 mL に FBS (MP Biomedicals, S1820) を 40 mL および抗生物質溶液 (注射用ペニシリン G カリウム 20 万単位 (Meiji Seika Pharma, 4987222637671) および 20 万 U と硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma, 4987222665643) 200 mg を滅菌水 1 mL に溶解) を 200 μ L を加えたのち、転倒混和することで作製した。

4-1-2. Trypsin 溶液の調製

Trypsin 溶液は、0.5w/v% trypsin-5.3mmol/L EDTA・4Na solution without phenol red (和光純薬工業, 208-17251) 100 mL に PBS (和光純薬工業, 163-25265) 900 mL を加え、121 °C、2 気圧、20 分間オートクレーブにより滅菌処理することで作製した。

4-1-3. ヒト細胞の培養

ヒト細胞として、ヒト由来腺維芽細胞(HT-1080, RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, RCB1956)、ヒト由来神経芽細胞腫(SK-N-SH, RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, RCB0426)、ヒト由来子宮頸癌細胞 (HeLa, RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, RCB0007) を購入した。これら購入した細胞株を含むアンプルビン[®]を 37 °C の湯浴で融解したのち、10 mL の DMEM を含む 15 mL コーニングチューブに全量を移し、3,000 rpm、室温、3 分間遠心分離を行った。その後、上清を取り除き新たに DMEM を 10 mL 加え、細胞を懸濁後、再度 3,000 rpm、室温、3 分間遠心分離を行った。上清を除き DMEM 3 mL を加え細胞懸濁液としたのち、DMEM 4 mL を含む 25 cm² 細胞培養用ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG, 90026) に 500 μL または 1,000 μL 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で培養を行った。

4-1-4. ヒト細胞の継代

72-96 時間程度培養したヒト細胞を含む細胞培養用ディッシュについて、25

cm²細胞培養用ディッシュから DMEM 除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、trypsin 溶液を 2 mL 加え、ディッシュから細胞を剥がした。その後、DMEM 2 mL を加え細胞懸濁液とした。これら細胞懸濁液について、DMEM 4 mL を含む 25 cm²細胞培養用ディッシュに 500 μL または 1000 μL 加え、37 °C、CO₂ 濃度 5 %の条件下で再度培養を行った。

4-2. 蛍光基質 1-13 を用いた新規糖鎖修飾酵素の探索

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられた共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FluoView FV1000-D) により記録した。2MeTG の測定は Alexa Fluor 488 (Ex, 473 nm; dichroic filter, 405/473; and Em, 490–590 nm)。Lyso-IDTM Green の測定は FITC (Ex, 473 nm; dichroic filter, 405/473; and Em, 490–590 nm)。Resorufin の測定は Alexa Fluor 568 (Ex, 559 nm; dichroic filter, 405/473/559; Em, 575–675 nm)。TFMU の測定は DAPI (Ex, 405 nm; dichroic filter, 405/473; Em, 430–455 nm)。また、細胞数は countess TM automated cell counter (invitrogen, C10227) によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。

4-2-1. 蛍光基質 1-3 を用いた新規 β-N-アセチルグルコサミニダーゼの探索

DMEM を 1 mL を加えた μ-Dish (ibidi, ib81156) に HT-1080 細胞、HeLa 細胞または SK-N-SH 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C、CO₂ 濃度 5 %の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μM となるように 2 mM 蛍光基質 1 (1 mg 蛍光基質 1 / 771 μL DMSO)、2 mM 蛍光基質 2 (1 mg 蛍光基質 2 / 751 μL DMSO) または 2 mM 蛍光基質 3 (1 mg 蛍光基質 3 / 678 μL DMSO) 溶液を 5 μL それぞれ加え、37 °C、CO₂ 濃度 5 %の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、

10% formalin solution (和光純薬工業, 064-03843) で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-2. Lyso-ID Green による蛍光基質 1-3 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HeLa 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μ M となるように 2 mM 蛍光基質 1 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。培養後、DMEM を除去し、Lyso-ID Green assay kit (Enzo Life Sciences, ENZ-51034) のマニュアルに従って調製した Lyso-ID Green および Hoechst 33342 混合溶液を 200 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 30 分間培養した。その後、Lyso-ID Green assay kit に含まれる assay buffer を用いて細胞を 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-3. Chloroquine による蛍光基質 1-3 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HeLa 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 75 μ M となるように 15 mM chloroquine diphosphate (1 mg chloroquine diphosphate / 1.29 mL H₂O) 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。続いて、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、2 mM 蛍光基質 1 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により

観察を行った。

4-2-4. 蛍光基質 4-7 を用いた新規 β -ガラクトシダーゼの探索

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HT-1080 細胞、HeLa 細胞または SK-N-SH 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM 蛍光基質 4 (1 mg 蛍光基質 4 / 770 μL DMSO)、2 mM 蛍光基質 5 (1 mg 蛍光基質 5 / 750 μL DMSO)、2 mM 蛍光基質 6 (1 mg 蛍光基質 3 / 677 μL DMSO) または 2 mM 蛍光基質 7 (1 mg 蛍光基質 7 / 876 μL DMSO) 溶液を 5 μL それぞれ加え、 37°C , CO_2 濃度 5 % の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-5. Golgi-ID Green による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HeLa 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM 蛍光基質 4 溶液を 5 μL 加え、 37°C , CO_2 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。培養後、DMEM を除去し、Golgi-ID Green assay kit (Enzo Life Sciences, ENZ-51028) のマニュアルに従って調製した Golgi-ID Green 溶液を 200 μL 加え、 37°C , CO_2 濃度 5 % の条件下で 30 分間培養した。その後、Golgi-ID Green assay kit に含まれる assay buffer を用いて細胞を 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-6. BODIPY TR ceramide による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HeLa 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM 蛍光基質 6 溶液を $5 \mu\text{L}$ 加え、 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、1% BSA を含む PBS 1 mL および 1 mM BODIPY TR ceramide DMSO solution $5 \mu\text{L}$ を加え、 4°C で 30 分間振盪した。続いて、PBS を用いて細胞を 3 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-7. Brefeldin A による蛍光基質 4-7 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HT-1080 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM 蛍光基質 6 溶液を $5 \mu\text{L}$ および終濃度 216 nM となるように $11 \mu\text{M}$ Brefeldin A (1 mg Brefeldin A / $156.6 \mu\text{L H}_2\text{O}$) 溶液を $20 \mu\text{L}$ 加え、 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-8. 蛍光基質 8-13 を用いた新規 α -L-フコシダーゼの探索

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HT-1080 細胞、HeLa 細胞または SK-N-SH 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5% の条

件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μ M となるように 2 mM 蛍光基質 **8** (1 mg 蛍光基質 **8** / 845 μ L DMSO)、2 mM 蛍光基質 **9** (1 mg 蛍光基質 **9** / 822 μ L DMSO)、2 mM 蛍光基質 **10** (1 mg 蛍光基質 **10** / 735 μ L DMSO)、2 mM 蛍光基質 **11** (1 mg 蛍光基質 **11** / 1074 μ L DMSO)、2 mM 蛍光基質 **12** (1 mg 蛍光基質 **12** / 1036 μ L DMSO) または 2 mM 蛍光基質 **13** (1 mg 蛍光基質 **13** / 902 μ L DMSO) 溶液を 5 μ L それぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-9. Lyso-ID Green による蛍光基質 8-13 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HT-1080 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μ M となるように 2 mM 蛍光基質 **8** または 2 mM 蛍光基質 **11** 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。培養後、DMEM を除去し、Lyso-ID Green assay kit のマニュアルに従って調製した Lyso-ID Green 溶液を 200 μ L 加え、37 °C , CO₂ 濃度 5 % の条件下で 30 分間培養した。その後、Lyso-ID Green assay kit に含まれる assay buffer を用いて細胞を 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-2-10. Chloroquine による蛍光基質 8-13 の染色部位の同定

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HT-1080 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、

DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 75 μ M となるように 15 mM chloroquine diphosphate (1 mg chloroquine diphosphate / 1.29 mL H₂O) 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。続いて、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、2 mM 蛍光基質 **8** 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 1 時間培養した。続いて、DMEM を除去し、Lyso-ID Green assay kit のマニュアルに従って調製した Lyso-ID Green 溶液を 200 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 30 分間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-3. Anti-GLB1 抗体を用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられた共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM 510 META) により記録した。蛍光基質 **6** の 2MeTG は Ex, 488 nm; Em, 505–530 nm、二次抗体の CF568 は Ex, 543 nm; Em, >560 nm で測定した。

DMEM を 1 mL を加えた glass based dish (IWAKI, 3971-035) に HeLa 細胞を 5.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μ M となるように 2 mM 蛍光基質 **4** 溶液を 5 μ L 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。続いて、DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄したのち、4% formalin solution を用いて 20 分間室温で細胞を固定し、PBS で 2 回洗浄後、10% donor calf serum を含む PBS を 1 mL 加え、20 分間室温で振盪した。その後、一次抗体溶液 (rabbit anti-GLB1 (Sigma-Aldrich, SAB1100169): PBS containing 10% donor calf serum = 1: 800) を加え、20 分間室温で振盪した。次に、一次抗体溶液を除去、PBS で洗浄したのち、二次抗体溶液 (anti-rabbit IgG (highly cross-adsorbed, CF568 produced in goat; Sigma-Aldrich, SAB4600085): PBS containing 10%

donor calf serum = 1: 1000) を加え、20 分間室温で振盪した。最後に二次抗体溶液を除去、PBS で 4 回洗浄したのち、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-4. TokyoGreen β -Gal 用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられた共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FluoView FV1000-D) により記録した。2MeTG は Alexa Fluor 488 (Ex, 473 nm; dichroic filter, 405/473; and Em, 490–590 nm) で測定した。

DMEM を 1 mL を加えた μ -Dish に HeLa 細胞を 4.0×10^4 cells/well となるようにそれぞれ播種し、 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM 蛍光基質 **6** を $5 \mu\text{L}$ 、終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように 2 mM TG β -gal $5 \mu\text{L}$ または終濃度 $30 \mu\text{M}$ となるように 5 mM TG β -gal $6 \mu\text{L}$ 加え、終濃度 $10 \mu\text{M}$ の 2 つは 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 1 時間、終濃度 $30 \mu\text{M}$ のものは 37°C , CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。培養後、DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄したのち、10% formalin solution で細胞を固定し、PBS 1 mL 加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-5. 蛍光基質および光親和性プローブの合成

シリカゲルカラムクロマトグラフィーはシリカゲル 60N (関東化学, 37560-85) を用いて行い、反応過程の追跡は TLC ガラスプレート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck, 105715) を用いて行った。また、合成した化合物については $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HMQC, 質量分析 (イオン化法: ESI および DUIS) によって目的の構造であること、および元素分析によって高純度で精製されていることを確認

した。

4-5-1. 各蛍光基質の共通部分および緑色蛍光団の合成

化合物 15 の合成

4-Hydroxy benzylalcohol (Sigma-Aldrich, H20806, 4.12 g, 33.2 mmol) を脱水 DMF 100 mL に溶解し、NaH (2.00 g, 49.7 mmol)、TBSCl (東京化成工業, B0995, 15.00 g, 33.2 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 15 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 400 mL の H₂O に注ぎ、400 mL の Et₂O で 2 回抽出した。さらに、抽出した Et₂O 層を混合し、400 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄した。洗浄後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 5 : 1) により精製することで、化合物 15 (7.09 g, 89.7%) を得た。

化合物 16 の合成

2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (東京化成工業, T0118, 2.51 g, 10.19 mmol) に 20 mL の H₂O 加え、オートクレーブ中で 200 °C、6 時間、6 atm 条件下で攪拌し反応を終了した。反応液をろ過し、残渣に 25 mL の H₂O を加え、60 °C で 15 分間還流し、30 °C まで放冷した後、反応液をろ過した。その後、減圧下で H₂O を留去し、化合物 16 (2.32 g, 99.7%) を得た。

化合物 17 の合成

化合物 16 (1.30 g, 5.68 mmol) を脱水 DMF 20 mL に溶解し、Imidazole (東京化成工業, I0001, 3.90 g, 57.29 mmol)、TBSCl (5.15 g, 34.17 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 17 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の H₂O に注ぎ、200 mL の Et₂O で 3 回抽出した。さらに、抽出した Et₂O 層を混合し、400 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄した。洗浄後、減圧下で溶媒を留去し、最少量の 99.5 % EtOH を加え、加熱により残渣を完全に溶解したのち、4 °C で再結晶を行い、化

化合物 **17** (1.61 g, 62.2%) を得た。

化合物 **18** (2MeTG) の合成

化合物 **17** (0.51 g, 1.12 mmol) を脱水 THF 8 mL に溶解し、溶液を -20 °C とした。そこへ、*o*-tolylmagnesiumbromide 19 % in THF, ca. 1 mol/L (東京化成工業, T1698, 2.50 mL, 2.50 mmol) を加え、窒素雰囲気下で 2 時間反応後、低温反応装置の冷却を切り徐々に室温にした。冷却を切ってから 16 時間攪拌後、反応液に MeOH 10 mL を加え反応を停止させた。その後、減圧下で溶媒を留去し、CH₂Cl₂ 50 mL および TFA 5 mL を加え、室温で 2 時間攪拌し反応を終了した。減圧条件下で溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) により精製することで、化合物 **18** (2MeTG, 0.30 g, 88.5 %) を得た。

4-5-2. β-N-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質 **1-3** の合成

化合物 **19** の合成

N-Acetyl-D-glucosamine (東京化成工業, A0092, 5.00 g, 22.60 mmol) に AcCl (和光純薬工業, 011-00553, 10.0 mL, 22.60 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 25 時間攪拌し反応させたのち、40 mL CH₂Cl₂ および氷冷水を加え反応を停止させた。反応液を 50 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 50 mL の重曹水飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、最少量の Et₂O を加え、4 °C で再結晶を行い、化合物 **19** (5.72 g, 69.1%) を得た。

化合物 **20** の合成

化合物 **19** (1.00 g, 2.73 mmol) を脱水 CH₂Cl₂ 10 mL に溶解し、4-hydroxybenzaldehyde (東京化成工業, H0198, 0.67 g, 5.47 mmol)、tetrabutylammonium hydrogen sulfate (東京化成工業, T0835, 0.93 g, 2.73 mmol)、1M NaOH 水溶液 (10

mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 100 mL の H₂O に注ぎ、100 mL の ethyl acetate で 3 回抽出した。さらに、抽出した ethyl acetate 層を混合し、300 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) により精製することで、化合物 **20** (1.08 g, 87.1%) を得た。

化合物 **21** の合成

化合物 **20** (0.68 g, 1.52 mmol) を MeOH 30 mL に溶解し、NaBH₄ (和光純薬工業、192-01472, 0.02 g, 0.45 mmol) を加え、0 °C で 1 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 100 mL の 1M HCl 水溶液に注ぎ、100 mL の ethyl acetate で 3 回抽出した。さらに、抽出した ethyl acetate 層を混合し、300 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 300 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) により精製することで、化合物 **21** (0.38 g, 55.0%) を得た。

蛍光基質 **1** の合成

化合物 **21** (0.26 g, 0.56 mmol) を脱水 THF 15 mL に溶解し、ADDP (東京化成工業、A1051, 0.85 g, 3.38 mmol)、TBP (東京化成工業、T0361, 0.85 mL, 3.38 mmol)、resorufin (Sigma-Aldrich, 424455, 0.14 g, 0.68 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 時間 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate および CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) によりそれぞれ 2 回精製することで、蛍光基質 **1** (0.23 g, 62.9%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₃H₃₂N₂O₁₂: C, 61.11; H, 4.97; N, 4.32. Found: C, 61.12; H, 4.96; N, 4.15.

DUIS-MS (positive mode): $m/z = 649 [M + H]^+$ and $671 [M + Na]^+$, (negative mode): $m/z = 647 [M - H]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.96 (s, $-\text{CH}_3$, NHAc), 2.05 (s, $-\text{CH}_3$, OAc), 2.07 (s, 2x $-\text{CH}_3$, OAc), 3.88 (ddd, 1H, $J_{4-5}=10.3$ Hz, $J_{5-6a}=2.5$ Hz, $J_{5-6b}=5.3$ Hz, H-5), 4.10 (ddd, 1H, $J_{1-2}=8.5$ Hz, $J_{2-3}=10.5$ Hz, $J_{2-\text{NH}}=8.5$ Hz, H-2), 4.16 (dd, 1H, $J_{5-6a}=2.5$ Hz, $J_{6a-6b}=12.5$ Hz, H-6a), 4.29 (dd, 1H, $J_{5-6b}=5.0$ Hz, $J_{6a-6b}=12.0$ Hz, H-6b), 5.10 (s, 2H, benzyl position), 5.15 (dd, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=9.8$ Hz, H-4), 5.33 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.44 (dd, 1H, $J_2=10.5$ Hz, $J_{3-4}=9.5$ Hz, H-3), 5.66 (d, 1H, $J_{2-\text{NH}}=8.5$ Hz, $-\text{NHAc}$), 6.31 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J=2.3$ Hz, 10.3 Hz), 6.86 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 6.98 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz, 9.0 Hz), 7.03 (d, 2H, $J=9.0$ Hz), 7.36 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.42 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 7.70 (d, 1H, $J=8.5$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 20.74 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.81 (2x $-\text{CH}_3$, Ac), 23.46 ($-\text{CH}_3$, Ac), 54.99 (C2), 62.16 (C6), 68.49 (C4), 70.47 (benzyl position), 71.90 (C3), 72.12 (C5), 98.77 (C1), 101.09, 106.84, 114.31, 117.23, 128.56, 129.26, 130.09, 131.70, 134.35, 134.79, 145.66, 145.78, 149.86, 157.19, 162.61, 169.50, 170.44, 170.67, 170.92 (4x $-\text{C}=\text{O}$, Ac), 186.40 ($-\text{C}=\text{O}$, resorufin).

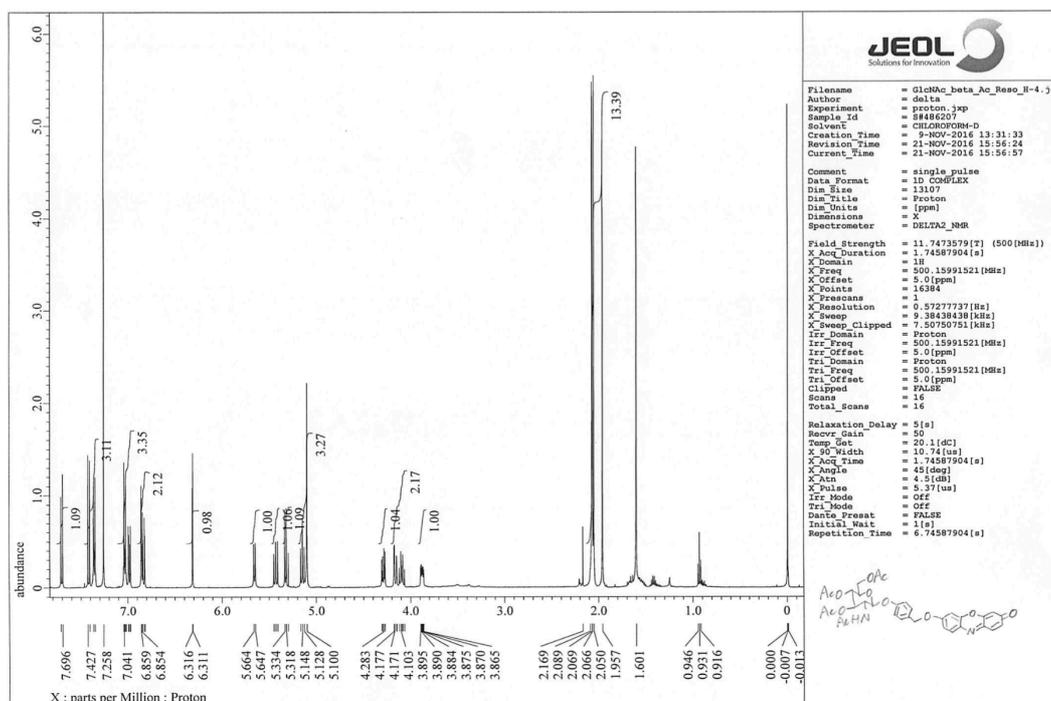


Figure 22. 蛍光基質 **1** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

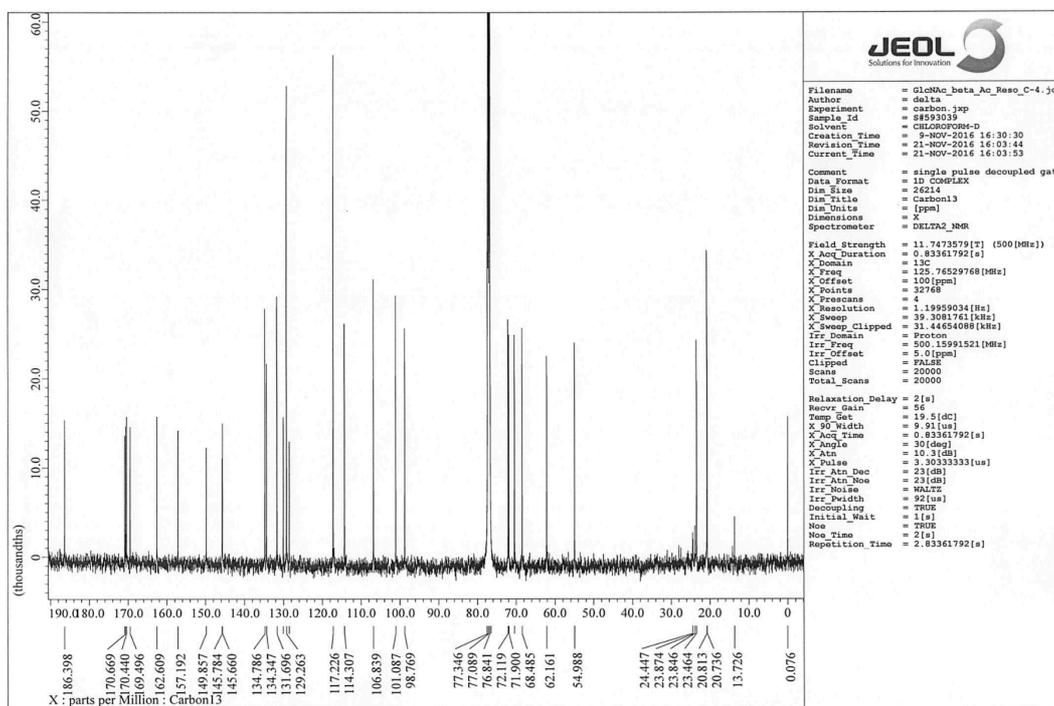


Figure 23. 蛍光基質 **1** の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 **2** の合成

化合物 **21** (0.24 g, 0.52 mmol) を脱水 THF 15 mL に溶解し、ADDP (0.79 g, 3.13 mmol)、TBP (0.80 mL, 3.13 mmol)、TFMU (Santa Cruz Biotechnology; sc-210622A, 0.14 g, 0.63 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌し反応を終了した。反応液を200 mLのethyl acetateに注ぎ、200 mLの飽和 NaHCO_3 溶液および200 mLの飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na_2SO_4 を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate) で1回、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 10:1) で2回精製することで、蛍光基質 **2** (0.29 g, 83.2%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{NO}_{12}$: C, 55.94; H, 4.54; N, 2.10; Found: C, 56.05; H, 4.73; N, 2.06.

DUI-MS (positive mode): m/z = 666 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and 688 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (negative mode): m/z = 664 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 : $\text{CD}_3\text{OD} = 4:1$): δ 1.94 (s, $-\text{CH}_3$, NHAc), 2.07 (s, $2x$ $-\text{CH}_3$, OAc), 2.10 (s, $-\text{CH}_3$, OAc), 3.93 (ddd, 1H, $J_{4-5}=9.5$ Hz, $J_{5-6a}=2.5$ Hz, $J_{5-6b}=5.0$ Hz, H-5), 4.14-4.18 (m, 2H, H-2 and H-6a), 4.31 (dd, 1H, $J_{5-6b}=5.5$ Hz, $J_{6a-6b}=12.5$ Hz, H-6b), 5.13 (s, 2H, benzyl position), 5.13 (m, 1H, H-4), 5.31 (d, 1H, $J_{1-2}=8.5$ Hz, H-1), 5.37 (dd, 1H, $J_{2-3}=J_{3-4}=10.0$ Hz, H-3), 6.65 (s, 1H), 6.97 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J=2.3$ Hz, 9.3 Hz), 7.05 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.38 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.66 (d, 1H, $J=8.0$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 : $\text{CD}_3\text{OD} = 4:1$): δ 20.68 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.78 ($-\text{CH}_3$, Ac), 22.75 ($-\text{CH}_3$, Ac), 30.98 ($-\text{CH}_3$, Ac), 54.42 (C2), 62.38 (C6), 68.89 (C4), 70.42 (benzyl position), 71.93 (C3), 72.54 (C5), 98.78 (C1), 102.58, 107.411, 112.33, 114.37, 117.24, 121.74 (d, $J=274.3$ Hz, $-\text{CF}_3$), 126.62, 129.41, 130.17, 142.06 (q, $J_{\text{C-F}}=33.0$ Hz, $-\text{C}-\text{CF}_3$), 156.36, 157.36, 160.17, 162.82 ($-\text{C}=\text{O}$, TFMU), 170.11, 171.24, 171.37, 172.07 ($4x$ $-\text{C}=\text{O}$, Ac).

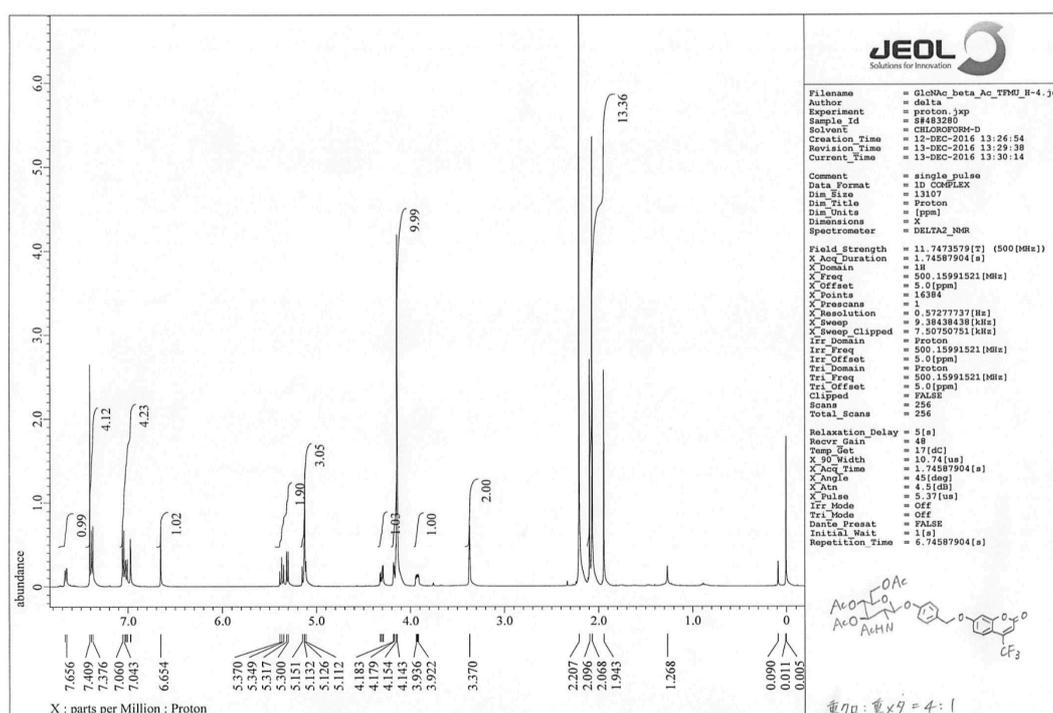


Figure 24. 蛍光基質 **2** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

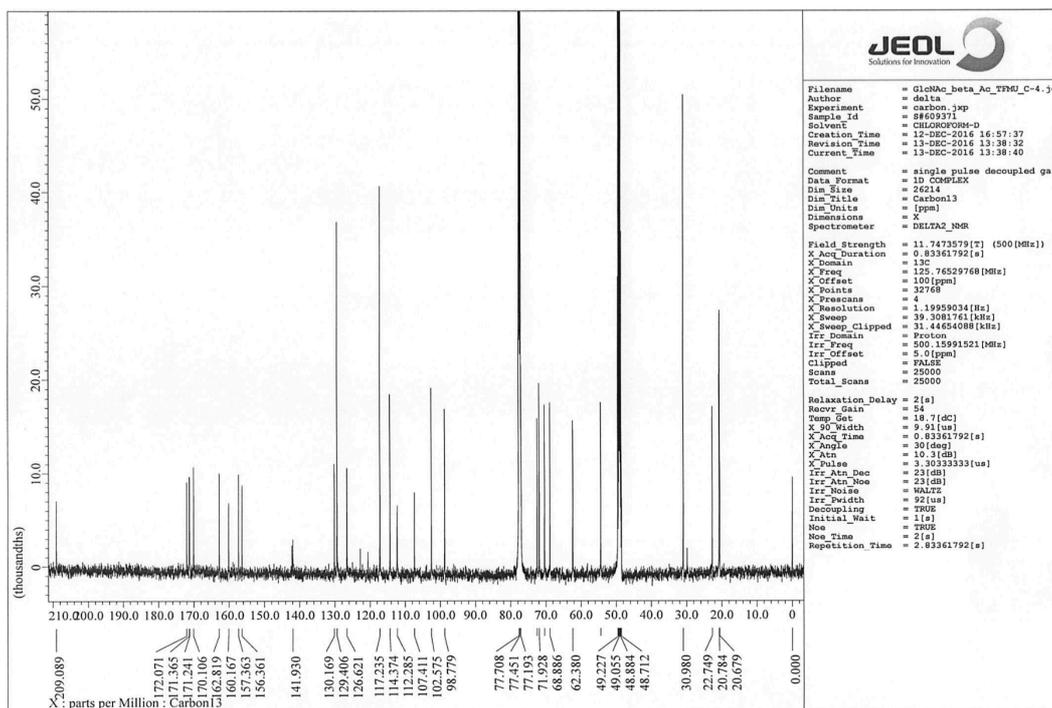


Figure 25. 蛍光基質 **2** の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 **3** の合成

化合物 **21** (0.27 g, 0.61 mmol) を脱水 THF 15 mL に溶解し、ADDP (0.92 g, 3.64 mmol)、TBP (0.90 mL, 3.64 mmol)、2MeTG (0.22 g, 0.73 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌し反応を終了した。反応液を200 mLのethyl acetateに注ぎ、200 mLの飽和 NaHCO_3 溶液および200 mLの飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na_2SO_4 を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 10:1) で5回精製することで、蛍光基質 **3** (0.42 g, 93.2%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{NO}_{12}$: C, 66.75; H, 5.33; N, 1.90. Found: C, 66.75; H, 5.30; N, 1.82.

DUI-MS (positive mode): m/z = 738 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and 760 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (negative mode): m/z = 736 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.97 (s, $-\text{CH}_3$, NHAc), 2.06 and 2.08 (s, 4x $-\text{CH}_3$, OAc and 2MeTG), 3.89 (ddd, 1H, $J_{4-5}=9.5$ Hz, $J_{5-6a}=2.6$ Hz, $J_{5-6b}=5.4$ Hz, H-5), 4.11 (ddd, 1H,

$J_{1-2} = 8.5$ Hz, $J_{2-3} = 10.5$ Hz, $J_{2-NH} = 8.5$ Hz, H-2), 4.17 (dd, 1H, $J_{5-6a} = 2.3$ Hz, $J_{6a-6b} = 12.3$ Hz, H-6a), 4.30 (dd, 1H, $J_{5-6b} = 5.3$ Hz, $J_{6a-6b} = 12.3$ Hz, H-6b), 5.12 (s, 2H, benzyl position), 5.16 (dd, 1H, $J_{3-4} = J_{4-5} = 9.8$ Hz, H-4), 5.35 (d, 1H, $J_{1-2} = 8.0$ Hz, H-1), 5.45 (dd, 1H, $J_{2-3} = J_{3-4} = 10.0$ Hz, H-3), 5.80 (d, 1H, $J_{2-NH} = 8.5$ Hz, -NHAc), 6.45 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 6.58 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, 9.5 Hz), 6.81 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, 9.0 Hz), 6.95 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.01 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.04 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.37 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.46 (ddd, 1H, $J = 1.5$ Hz, 7.5 Hz). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 19.65, 20.66, 20.73 (x2), 22.38 (4x $-\text{CH}_3$, Ac and $-\text{CH}_3$, 2MeTG), 54.90 (C2), 62.10 (C6), 68.45 (C4), 70.27 (benzyl position), 71.87 (C3), 72.03 (C5), 98.69 (C1), 101.31, 105.81, 114.01, 114.54, 117.17, 118.35, 126.14, 129.07, 129.18, 129.48, 129.53, 130.06, 130.16, 130.60 (x2), 132.46, 136.17, 149.40, 154.54, 157.13, 158.92, 163.24, 169.43, 170.41, 170.59, 170.82 (4x $-\text{C}=\text{O}$, Ac), 185.82 ($-\text{C}=\text{O}$, 2MeTG).

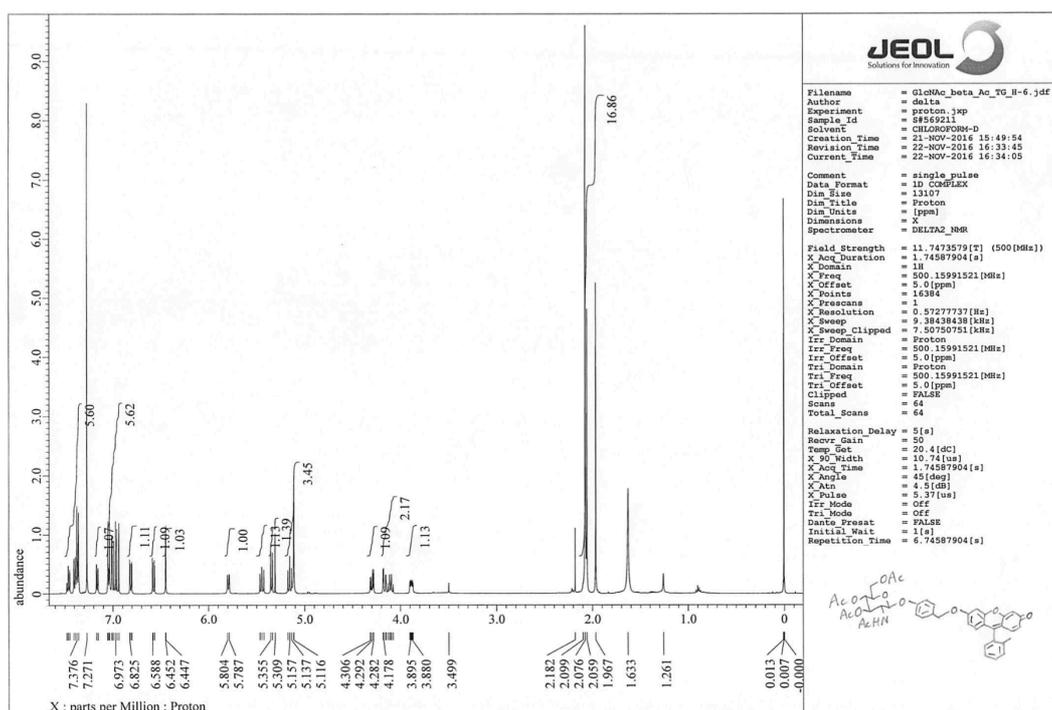


Figure 26. 蛍光基質 **3** の ^1H -NMR スペクトル

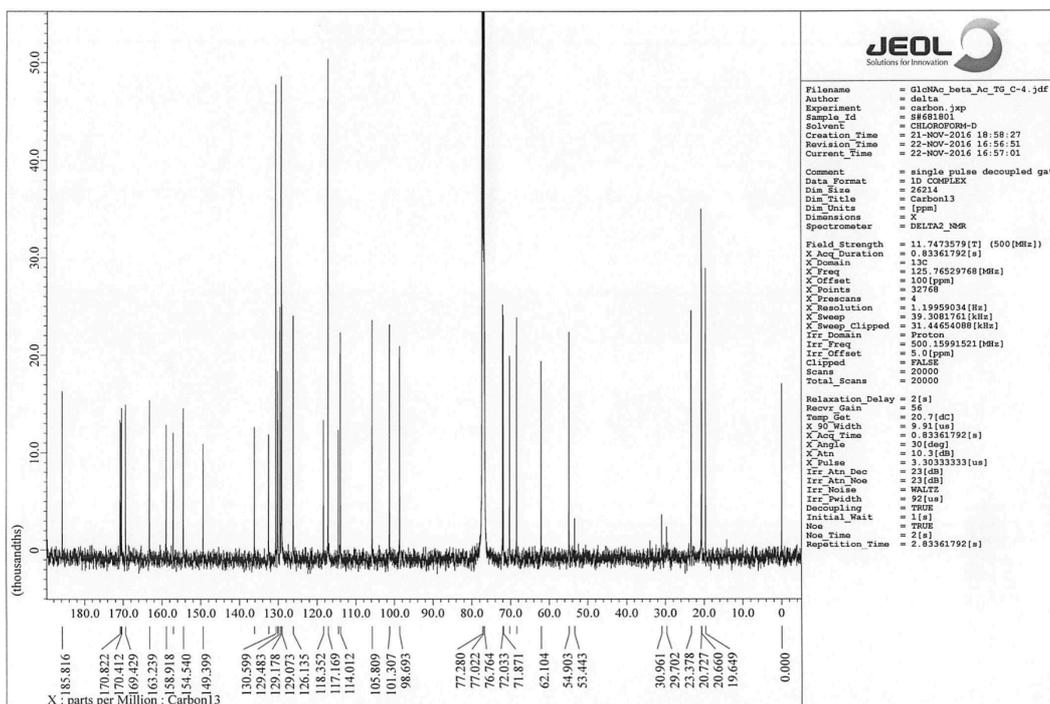


Figure 27. 蛍光基質 **3** の ^{13}C -NMR スペクトル

4-5-3. β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** の合成

化合物 **23** の合成

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl 2,2,2-Trichloroacetimidate (東京化成工業, T2295, 0.32 mg, 0.61 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 15 mL に溶解し、化合物 **15** (0.22 mg, 0.91 mmol) を加え、反応液を $-40\text{ }^\circ\text{C}$ としたのち、 $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (東京化成工業, B0527, 10 μL , 0.061 mmol) を加えて窒素雰囲気下、 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ で 25 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO_3 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na_2SO_4 を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 2 : 1) で精製することで、化合物 **22** (0.46 g) を得た。続いて得られた化合物 **22** を MeOH 10 mL に溶解し、DOWEX50W-X8 H^+ form (92.5 mg) を加え、室温で 9 時間攪拌し反応を終了した。その後、減圧下で溶媒

を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 1 : 2) で精製することで、化合物 **23** (0.20 g, 71.7%) を得た。

蛍光基質 **4** の合成

化合物 **23** (0.20 g, 0.44 mmol) を脱水 THF 20 mL に溶解し、ADDP (0.66 g, 2.62 mmol)、TBP (0.65 mL, 2.62 mmol)、resorufin (0.11 g, 0.52 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 時間 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 1 : 2) で 2 回、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) で 2 回精製することで、蛍光基質 **4** (0.15 g, 54.3%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₃H₃₁NO₁₃: C, 61.02; H, 4.81; N, 2.16. Found: C, 61.00; H, 4.95; N, 2.40.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 672 [M + Na]^+$, and $689 [M + K]^+$.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.19 (s, -CH₃, Ac), 4.07 (ddd, 1H, $J_{4-5}=1.0$ Hz, $J_{5-6a}=7.0$ Hz, H-5), 4.16 (dd, 1H, $J_{5-6a}=6.0$ Hz, $J_{6a-6b}=11.5$ Hz, H-6a), 4.24 (dd, 1H, $J_{5-6b}=6.5$ Hz, $J_{6a-6b}=11.5$ Hz, H-6b), 5.07 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.118 (s, 2H, benzyl position), 5.119 (dd, 1H, $J_{2-3}=10.5$ Hz, $J_{3-4}=3.5$ Hz, H-3), 5.47 (d, 1H, $J_{3-4}=3.5$ Hz, H-4), 5.50 (dd, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, $J_{2-3}=11.0$ Hz, H-2), 6.33 (d, 1H, $J=1.5$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J=2.0$ and 10.0 Hz), 6.87 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 7.00 (dd, 1H, $J=2.5$ and 9.0 Hz), 7.05 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.39 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 7.72 (d, 1H, $J=8.5$ Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 20.59 (-CH₃, Ac), 20.67 (2 x -CH₃, Ac), 20.75 (-CH₃, Ac), 61.28 (C6), 66.80 (C4), 68.58 (C2), 70.39, 70.77 (C3 and benzyl position), 71.07 (C5), 99.51 (C1), 101.02, 106.79, 114.19, 117.20, 128.51, 129.26, 130.24, 131.63, 134.30, 134.71, 145.60, 145.77, 149.79, 157.06, 162.52 (aromatic carbons), 169.37 (-C=O, Ac), 170.14 (-C=O, Ac), 170.22 (-C=O, Ac), 170.35 (-C=O, Ac), 186.31 (-C=O, resorufin).

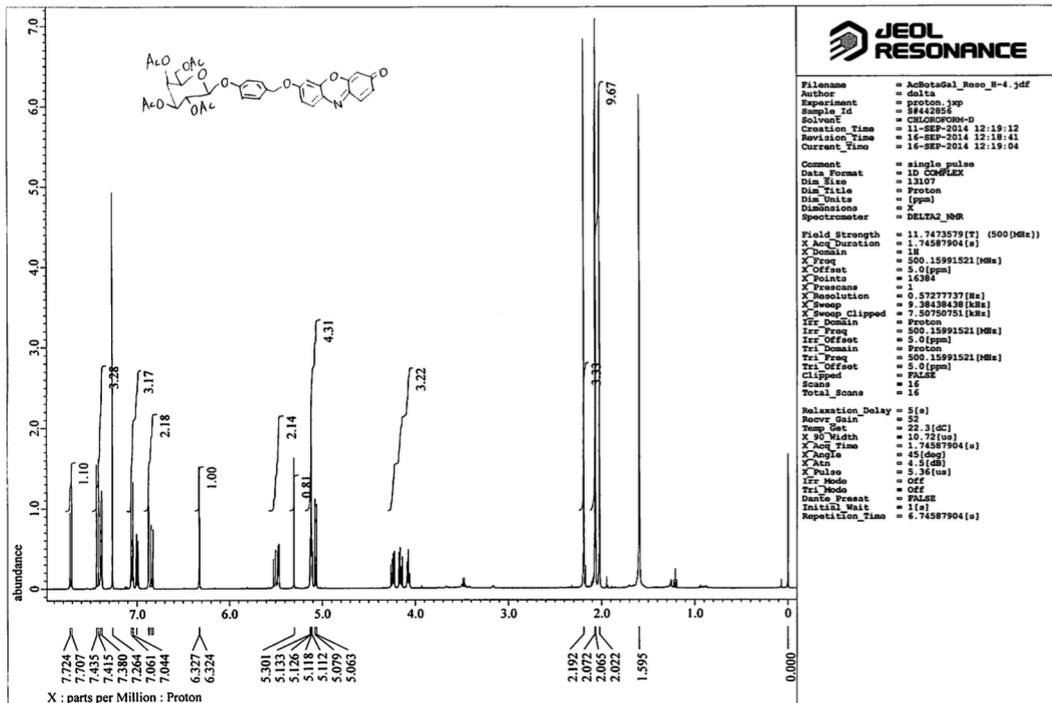


Figure 28. 蛍光基質 4 の ¹H-NMR スペクトル

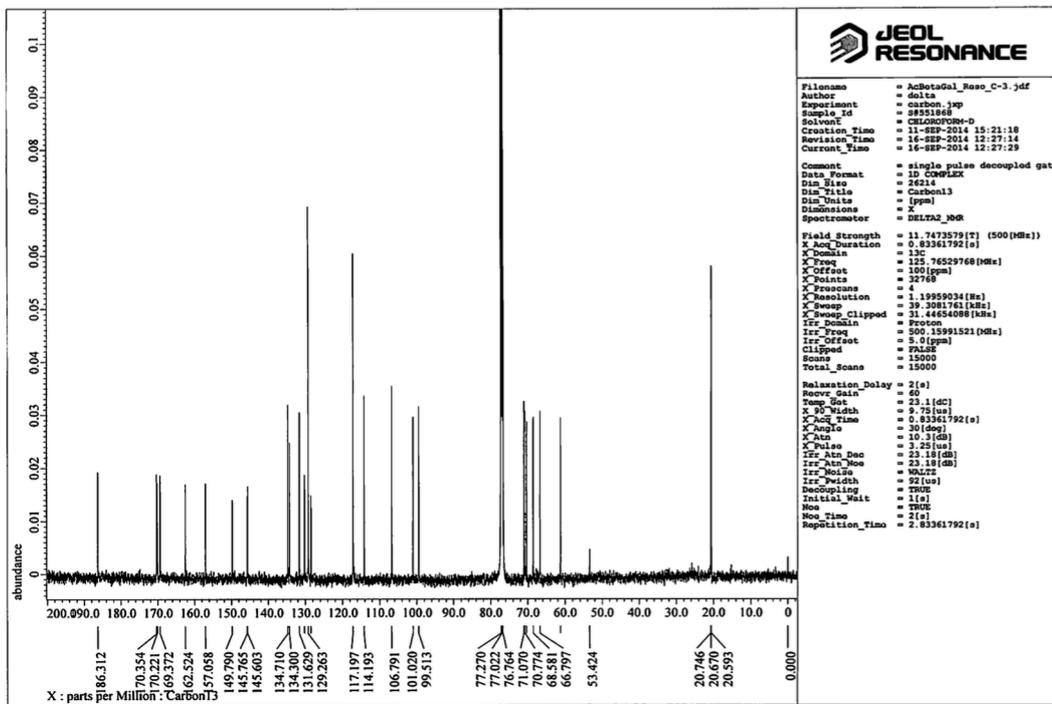


Figure 29. 蛍光基質 4 の ¹³C-NMR スペクトル

蛍光基質 **5** の合成

化合物 **23** (0.18 g, 0.40 mmol) を脱水 THF 20 mL に溶解し、ADDP (0.60 mg, 2.38 mmol)、TBP (0.74 mL, 2.38 mmol)、TFMU (0.11 g, 0.48 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 時間 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で 2 回精製することで、蛍光基質 **5** (0.15 g, 56.7%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₁H₂₉F₃O₁₃: C, 55.86; H, 4.39; N, 0.00; F, 8.55.

Found: C, 55.84; H, 4.65; N, 0.00; F, 8.30.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 689$ [M + Na]⁺, (negative mode): $m/z = 665$ [M - H]⁻.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.19 (s, -CH₃, Ac), 4.07 (dd, 1H, $J_{5-6a}=J_{5-6b}=7.0$ Hz, H-5), 4.16 (dd, 1H, $J_{5-6a}=6.5$ Hz, $J_{6a-6b}=11.5$ Hz, H-6a), 4.24 (dd, 1H, $J_{5-6b}=7.0$ Hz, $J_{6a-6b}=11.5$ Hz, H-6b), 5.06 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.10 (s, 2H, benzyl position), 5.12 (dd, 1H, $J_{2-3}=10.3$ Hz, $J_{3-4}=3.3$ Hz, H-3), 5.46 (dd, 1H, $J_{3-4}=3.5$ Hz, $J_{4-5}=1.5$ Hz, H-4), 5.50 (dd, 1H, $J_{1-2}=8.3$ Hz, $J_{2-3}=10.3$ Hz, H-2), 6.63 (s, 1H), 6.93 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 6.98 (dd, 1H, $J=2.5$ and 9.0 Hz), 7.04 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.64 (dd, 1H, $J=1.5$ and 8.5 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 20.60 (-CH₃, Ac), 20.68 (-CH₃, Ac), 20.76 (-CH₃, Ac), 21.07 (-CH₃, Ac), 61.32 (C6), 66.82 (C4), 68.59 (C2), 70.18 (benzyl position), 70.79 (C3), 71.08 (C5), 99.56 (C1), 102.38, 107.28, 112.45, 114.03, 117.24 (2x), 126.44, 129.23 (2x), 130.23 (aromatic carbons), 141.58 (-C-CF₃), 156.26, 157.07, 159.37 (aromatic carbons), 162.46 (-C=O, TFMU), 169.40 (-C=O, Ac), 170.15 (-C=O, Ac), 170.24 (-C=O, Ac), 170.36 (-C=O, Ac).

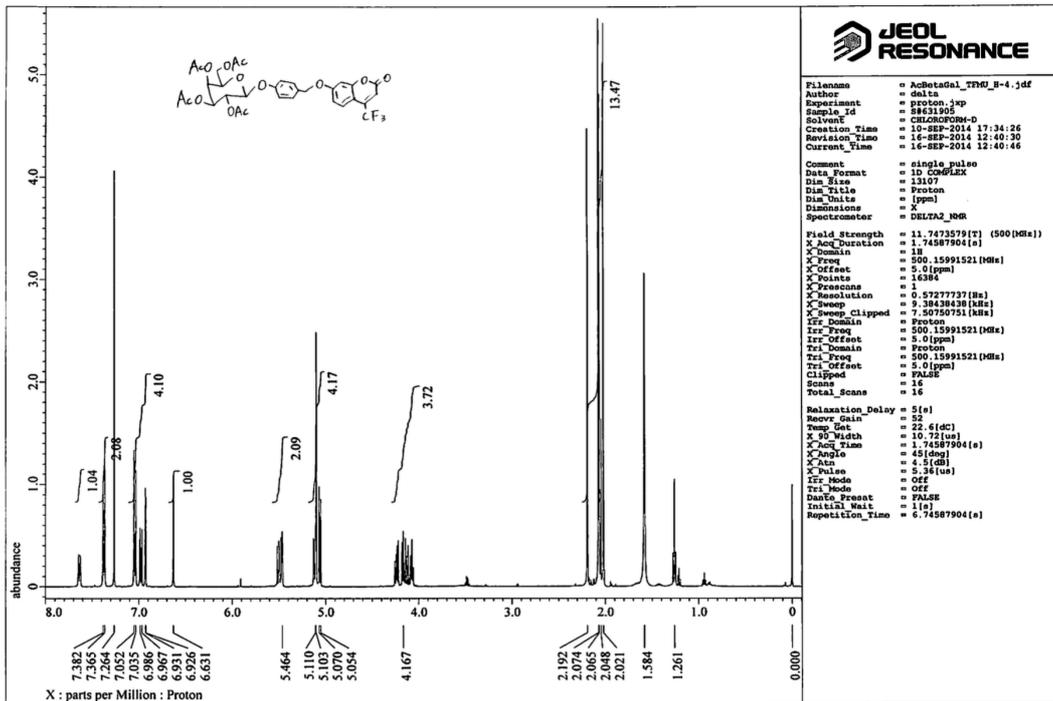


Figure 30. 蛍光基質 5 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

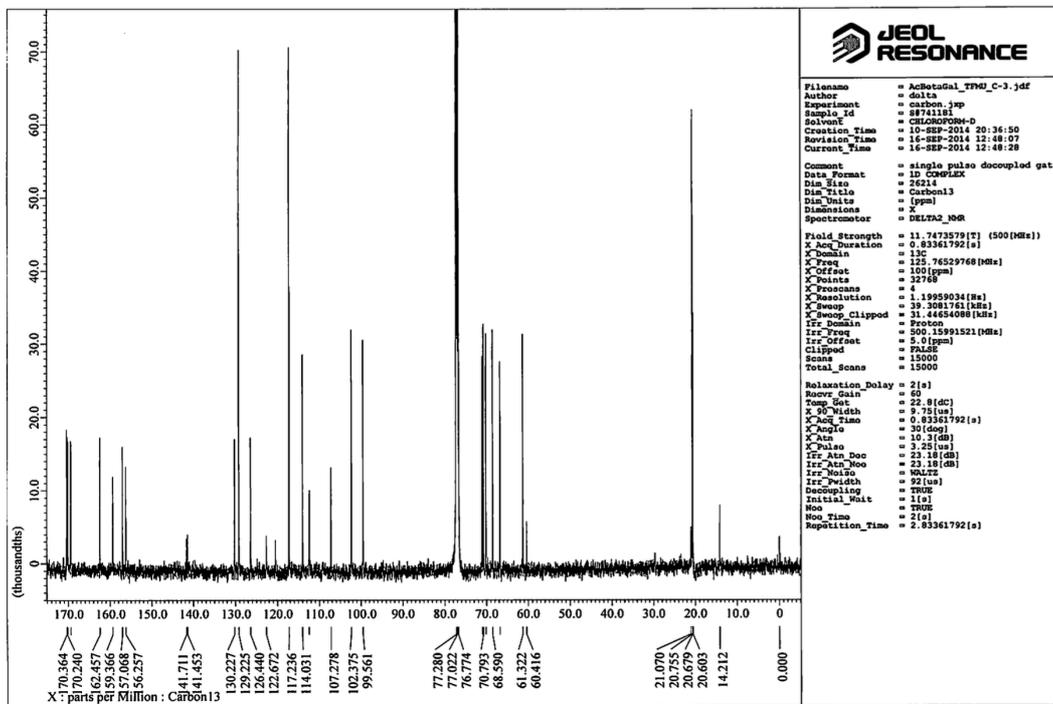


Figure 31. 蛍光基質 5 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

蛍光基質 **6** の合成

化合物 **23** (0.20 g, 0.44 mmol) を脱水 THF 20 mL に溶解し、ADDP (0.68 g, 2.61 mmol)、TBP (0.65 mL, 2.61 mmol)、2MeTG (0.16 g, 0.52 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 3 時間 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate) で 2 回精製することで、蛍光基質 **6** (0.15 g, 46.4%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₄₁H₃₈O₁₃: C, 66.66; H, 5.18; N, 0.00. Found: C, 66.64; H, 5.22; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 761$ [M + Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (s, -CH₃, Ac), 2.06 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.07 (s, -CH₃, Ac), 2.19 (s, 3H, -CH₃, 2MeTG), 4.07 (dd, 1H, $J_{5-6a}=J_{5-6b}=7.3$ Hz, H-5), 4.16 (dd, 1H, $J_{5-6a}=6.5$ Hz, $J_{6a-6b}=11.0$ Hz, H-6a), 4.24 (dd, 1H, $J_{5-6b}=7.0$ Hz, $J_{6a-6b}=11.5$ Hz, H-6b), 5.07 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.12 (dd, 1H, $J_{2-3}=10.3$ Hz, $J_{3-4}=3.3$ Hz, H-3), 5.12 (s, 2H, benzyl position), 5.46 (d, 1H, $J_{3-4}=3.5$ Hz, H-4), 5.50 (dd, 1H, $J_{1-2}=7.8$ Hz, $J_{2-3}=10.3$ Hz, H-2), 6.46 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.57 (dd, 1H, $J=1.8$ and 9.8 Hz), 6.82 (dd, 1H, $J=2.3$ and 9.8 Hz), 6.94 (d, 1H, $J=9.5$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J=9.0$ Hz), 7.02 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 7.05 (dd, 2H, $J=2.5$ and 7.0 Hz), 7.16 (d, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.37-7.40 (m, 4H), 7.46 (dd, 1H, $J=1.0$ and 7.5 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 19.64 (-CH₃, 2MeTG), 20.60 (-CH₃, Ac), 20.68 (2 x -CH₃, Ac), 20.75, (-CH₃, Ac), 61.29 (C6), 66.81 (C4), 68.61 (C2), 70.26 (benzyl position), 70.78 (C3), 71.08 (C5), 99.53 (C1), 101.32, 105.87, 113.95, 114.58, 117.21 (2x), 118.42, 126.14, 129.09, 129.28 (2x), 129.47, 129.52, 130.22, 130.31, 130.61, 132.50, 136.19, 149.22, 149.28, 154.55, 157.06, 158.90, 163.21 (aromatic carbons), 169.35 (-C=O, Ac), 170.15 (-C=O, Ac), 170.21 (-C=O, Ac), 170.34 (-C=O, Ac), 185.82 (-C=O, 2MeTG).

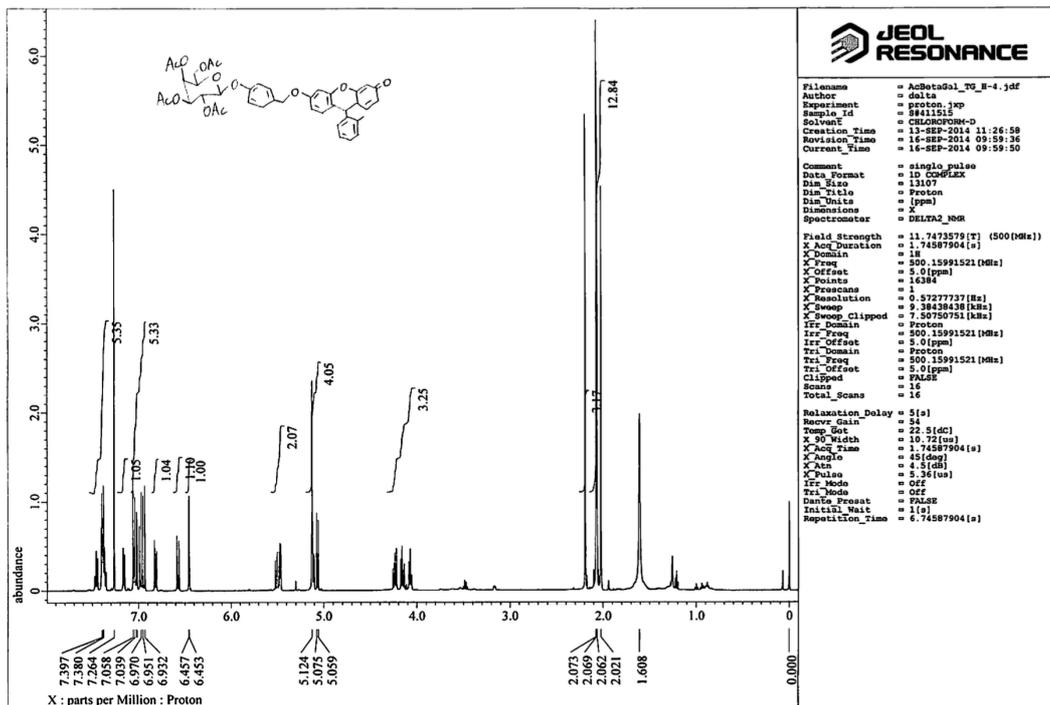


Figure 32. 蛍光基質 6 の ^1H -NMR スペクトル

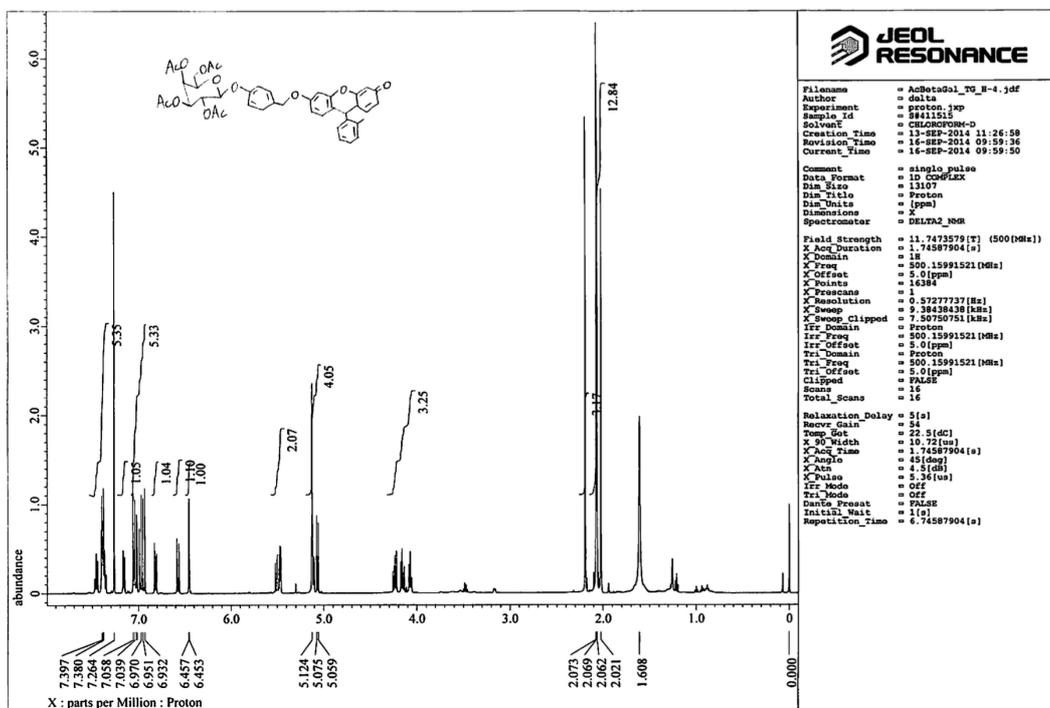


Figure 33. 蛍光基質 6 の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 7 の合成

蛍光基質 6 (0.11 g, 0.14 mmol) を MeOH 20 mL に溶解し、反応液を 0 °C としたのち、28% Sodium Methoxide Methanol Solution (和光純薬工業, 197-02463, 6 μ L) を加え、0 °C で 4 時間攪拌し反応を終了した。反応液に DOWEX 50W-X8 (H⁺ form) を加え中和したのち、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH = 5:1) で 3 回精製することで、蛍光基質 7 (51.4 mg, 62.6%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₃H₃₀O₉ · 1/2H₂O: C, 68.39; H, 5.39; N, 0.00. Found: C, 68.47; H, 5.55; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): m/z = 571 [M + H]⁺, (negative mode): m/z = 569 [M - H]⁻.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.02 (s, -CH₃, 2MeTG), 3.41 (ddd, 1H, J_{2-3} =9.5 Hz, J_{3-4} =3.8 Hz, J_{3-OH} =5.8 Hz, H-3), 3.49 (dd, 1H, J_{5-6a} = J_{6a-OH} =4.5 Hz, J_{6a-6b} =10.5 Hz, H-6a), 3.54 (dd, 1H, J_{5-6b} = J_{6b-OH} =5.3 Hz, J_{6a-6b} =11.3 Hz, H-6b), 3.56-3.59 (m, 2H, H-2 and H-5), 3.70 (dd, 1H, J_{3-4} = J_{4-OH} =4.0 Hz, H-4), 4.51 (d, 1H, J_{4-OH} =4.5 Hz, -OH of C4 position), 4.65 (dd, 1H, J_{6a-OH} = J_{6b-OH} =5.3 Hz, -OH of C6 position), 4.84 (1H, J_{1-2} =7.5 Hz, H-1), 4.86 (d, 1H, J_{3-OH} =5.5 Hz, -OH of C3 position), 5.17 (d, 1H, J_{2-OH} =5.0 Hz, -OH of C2 position), 5.22 (s, 2H, benzyl position), 6.25 (d, 1H, J =1.5 Hz), 6.44 (dd, 1H, J =1.8 and 9.8 Hz), 6.85 (d, 1H, J =9.5 Hz), 6.90 (d, 1H, J =9.0 Hz), 7.00 (dd, 1H, J =2.8 and 8.8 Hz), 7.28 (d, 1H, J =7.0 Hz), 7.32 (d, 1H, J =3.0 Hz), 7.41-7.54 (m, 5H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 19.11 (-CH₃, 2MeTG), 60.37 (C6), 68.13 (C4), 70.00 (C5), 70.25 (benzyl position), 73.30 (C3), 75.52 (C2), 100.87 (C1), 101.55, 104.77, 113.76, 114.40, 116.26, 117.33, 126.21, 129.06, 129.20, 129.54, 129.64, 130.50, 132.09, 135.62, 148.93, 153.95, 157.49, 158.40, 163.25 (aromatic carbons), 184.00 (-C=O, 2MeTG),

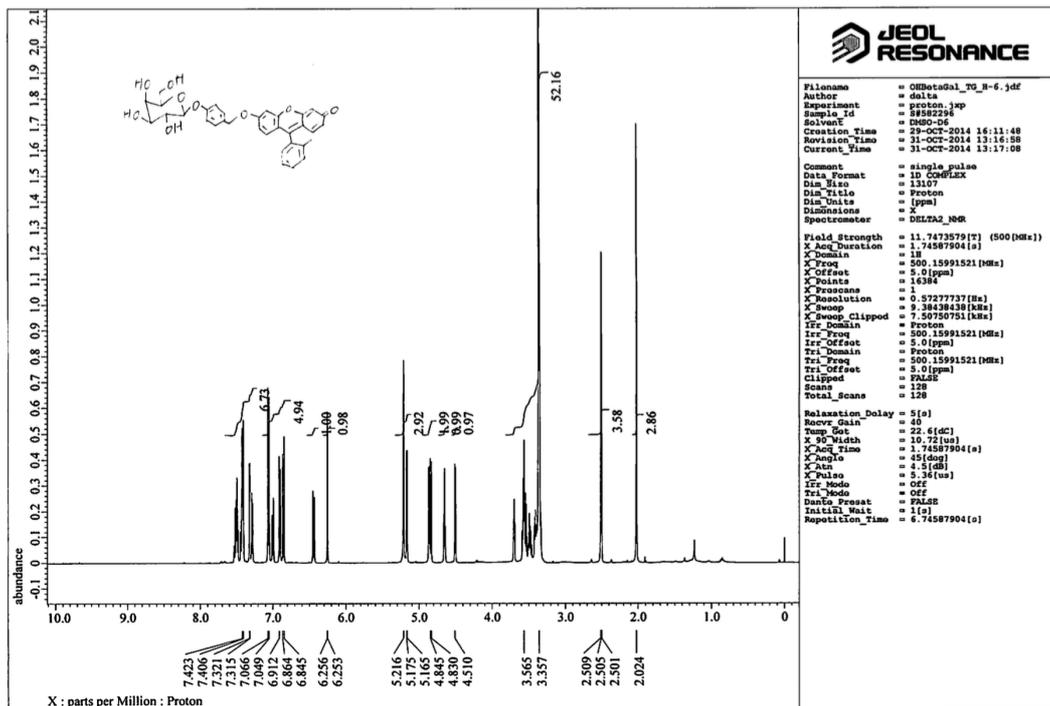


Figure 34. 蛍光基質 7 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

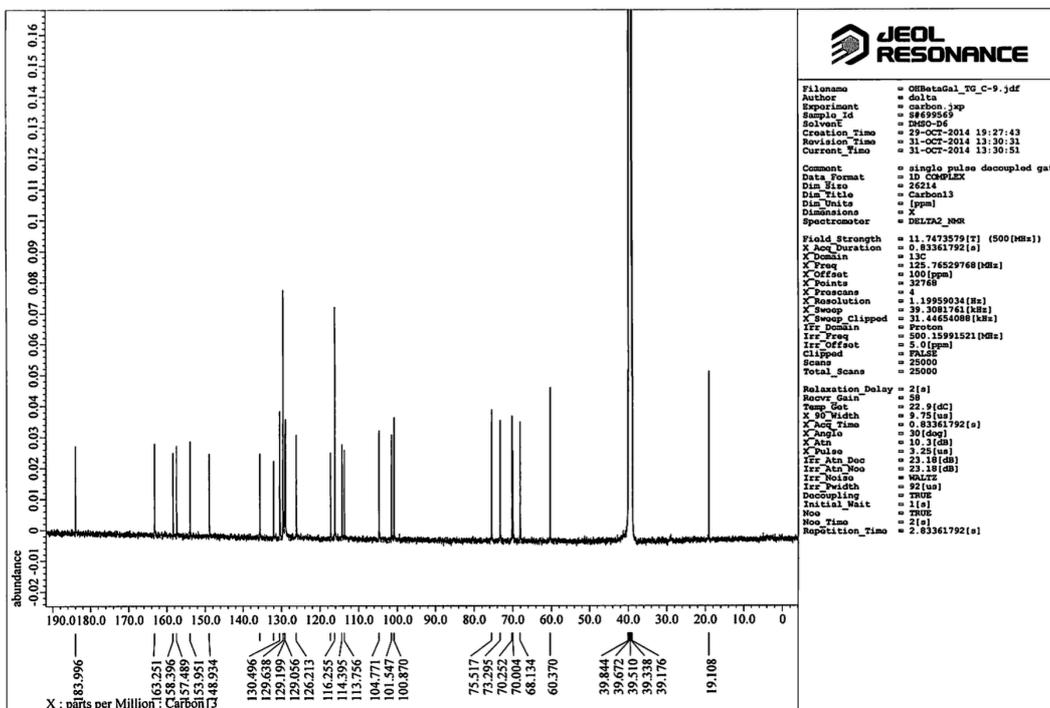


Figure 35. 蛍光基質 7 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

4-5-4. α -L-フコシダーゼのための蛍光基質 **8-13** の合成

化合物 **24** の合成

L-Fucose (Sigma-Aldrich, F2252, 5.00 g, 30.50 mmol) を pyridine 20 mL に溶解し、Ac₂O (和光純薬工業, 011-00276, 17.30 mL, 183.00 mmol) を加え、室温で 24 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の 1 M HCl 水溶液、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 2 : 1) で精製することで、化合物 **24** (9.90 g, 97.9%) を得た。

化合物 **25** の合成

化合物 **24** (1.76 g, 5.29 mmol) を溶媒 (1,2-dimethoxyethane: H₂O = 100: 1) 10 mL に溶解し、ammonium carbonate (4.80 g, 47.70 mmol) を加え、室温で 7 日間攪拌し反応を終了した。反応液をろ過したのち、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で精製することで、化合物 **25** (1.01 g, 65.7%) を得た。

化合物 **26** の合成

化合物 **25** (3.68 g, 12.7 mmol) を脱水 CH₂Cl₂ 20 mL に溶解し、1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene (和光純薬工業, 043-16383, 380 μ L, 2.53 mmol) および trichloroacetonitrile (和光純薬工業, 200-04641, 3.80 mL, 38.00 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の H₂O および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で精製することで、化合物 **26** (4.92 g, 89.4%) を得た。

化合物 **27** の合成

化合物 **26** (1.39 g, 3.21 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 30 mL に溶解し、反応液を $-40\text{ }^\circ\text{C}$ としたのち、化合物 **15** (1.15 g, 4.81 mmol) および $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (205 μL , 1.60 mmol) を加え、窒素雰囲気下、 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ で 10 分間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の飽和 NaHCO_3 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na_2SO_4 を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 2 : 1) で精製することで、化合物 **27** (1.56 g, 95.2%) を得た。

化合物 **28** の合成

化合物 **27** (0.40 g, 0.79 mmol) を MeOH 5 mL に溶解し、DOWEX 50W-X8 (H^+ form) (0.15 g) を加え、室温で 4 時間 30 分間攪拌し反応を終了した。反応液をろ過したのち、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 3 : 5) で精製することで、化合物 **28** (0.29 g, 92.4%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.28 (d, 3H, $J_{5-6}=6.3$ Hz, H-6), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, OAc), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, OAc), 2.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, OAc), 3.96 (qd, 1H, $J_{4-5}=7.5$ Hz, $J_{5-6}=6.3$ Hz, H-5), 4.65 (d, 2H, $J=5.2$ Hz, benzyl position), 5.04 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 5.11 (dd, 1H, $J=3.5$ Hz and 10.9 Hz), 5.31 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J=8.0$ Hz and 10.3 Hz), 7.00 (d, 1H, $J=8.6$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J=8.6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 16.17 (C6), 20.67 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.73 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.79 ($-\text{CH}_3$, Ac), 64.87, 68.71, 69.52, 69.99, 71.20, 99.58 (C1), 116.95, 128.52, 135.60, 156.68, 169.53 ($-\text{C}=\text{O}$, Ac), 170.27 ($-\text{C}=\text{O}$, Ac), 170.72 ($-\text{C}=\text{O}$, Ac).

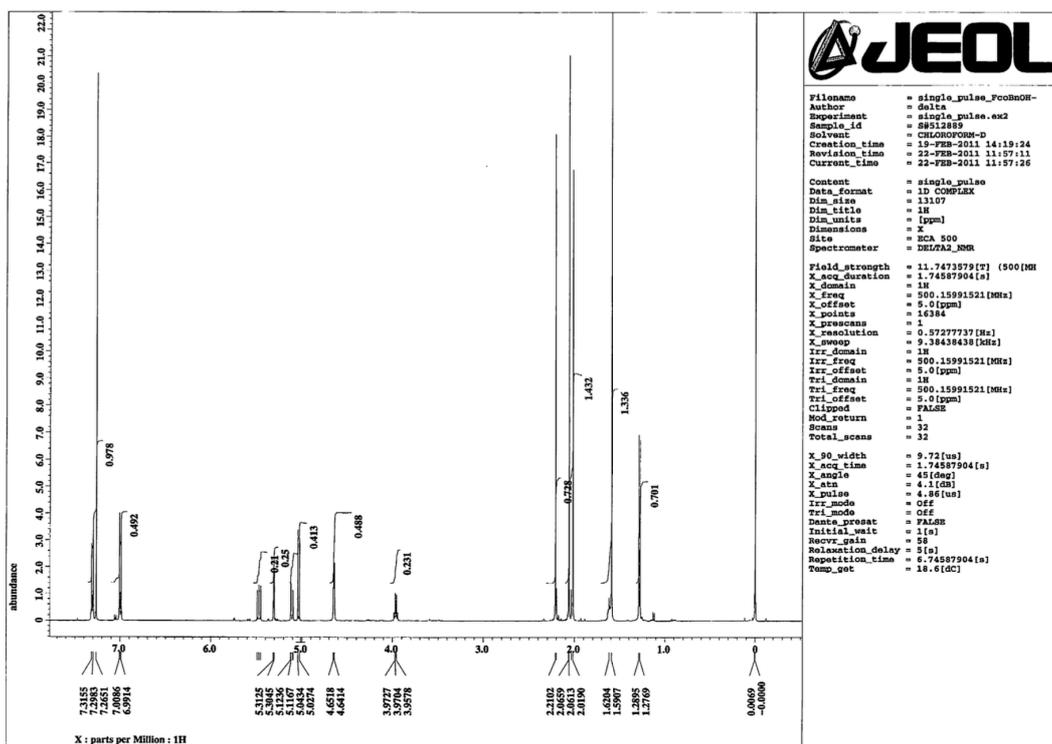


Figure 36. 化合物 28 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

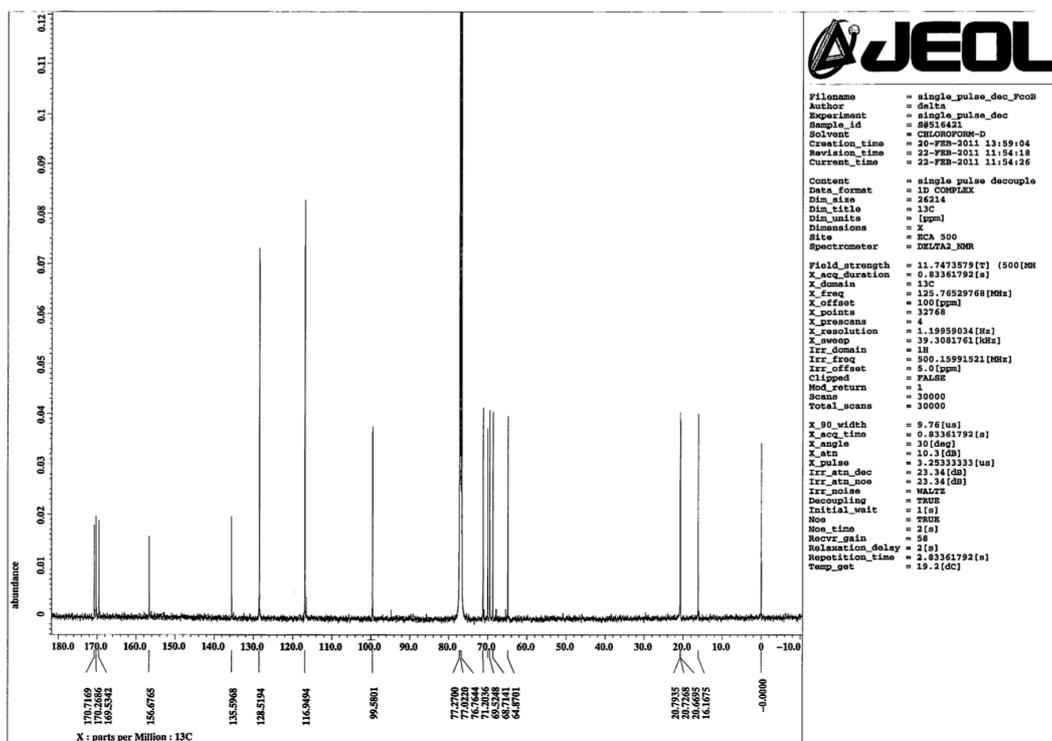


Figure 37. 化合物 28 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

蛍光基質 **8** の合成

化合物 **28** (0.11 g, 0.28 mmol) を脱水 THF 100 mL に溶解し、ADDP (0.43 g, 1.66 mmol)、TBP (0.41 mL, 1.66 mmol)、resorufin (0.073 g, 0.33 mmol) を加え、窒素雰囲気下、40 °C で 2 時間 30 分攪拌し反応を終了した。反応液を 150 mL の ethyl acetate に注ぎ、150 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 150 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) で精製することで、蛍光基質 **8** (0.14 g, 87.8%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₁H₂₉NO₁₁: C, 62.94; H, 4.94; N, 2.37. Found: C, 62.96; H, 4.94; N, 2.33.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 614$ [M + Na]⁺, (negative mode): $m/z = 590$ [M - H]⁻.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (d, 3H, $J_{5-6}=6.0$ Hz, H-6), 2.02 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.06 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.21 (s, 3H, -CH₃, OAc), 3.97 (qd, 1H, H-5), 5.07 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.10-5.13 (m, 3H, H-3 and benzyl position), 5.31 (d, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=3.5$ Hz, H-4), 5.48 (dd, 1H, $J_{1-2}=7.3$ Hz, $J_{2-3}=10.8$ Hz, H-2), 6.32 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz and 9.8 Hz), 6.87 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.99 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz and 9.0 Hz), 7.05 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.38 (d, 2H, $J=9.0$ Hz), 7.42 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 7.71 (d, 1H, $J=9.5$ Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.17 (C6), 20.63 (-CH₃, Ac), 20.69 (-CH₃, Ac), 20.77 (-CH₃, Ac), 68.71 (C2), 69.63 (C5), 69.98 (C4), 70.47 (benzyl position), 71.18 (C3), 99.37 (C1), 101.05, 106.79, 114.21, 117.11, 128.51, 129.24, 129.95, 131.62, 134.30, 134.71, 145.61, 145.77, 149.80, 157.27, 162.57, 169.46 (-C=O, Ac), 170.21 (-C=O, Ac), 170.64 (-C=O, Ac), 186.30 (-C=O, resorufin).

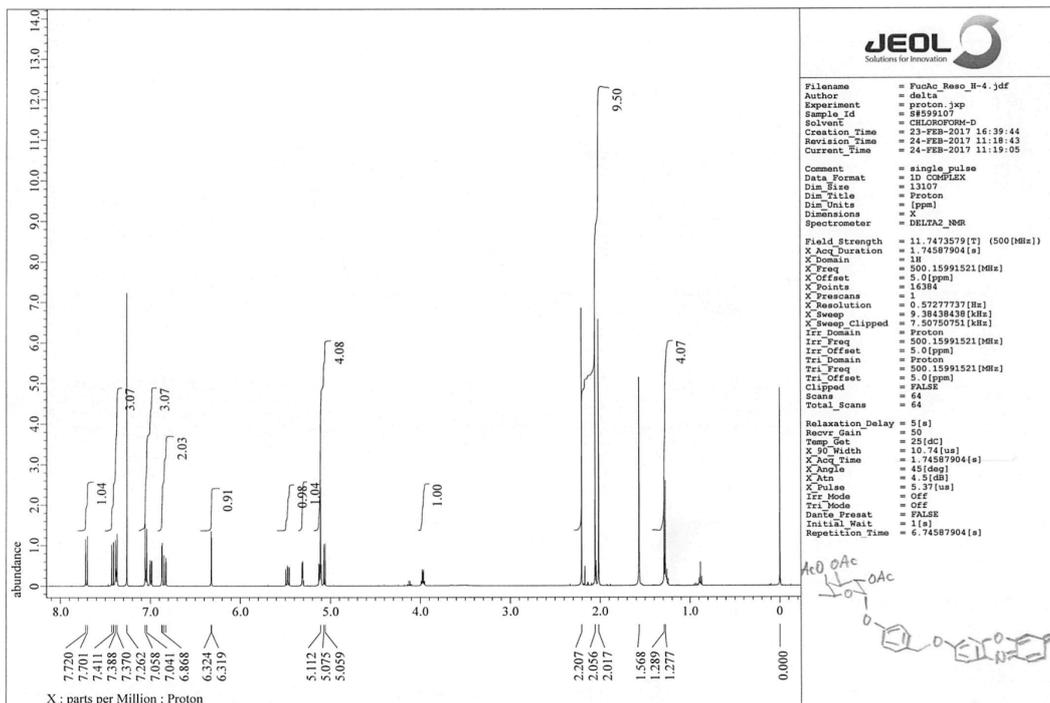


Figure 38. 蛍光基質 **8** の ^1H -NMR スペクトル

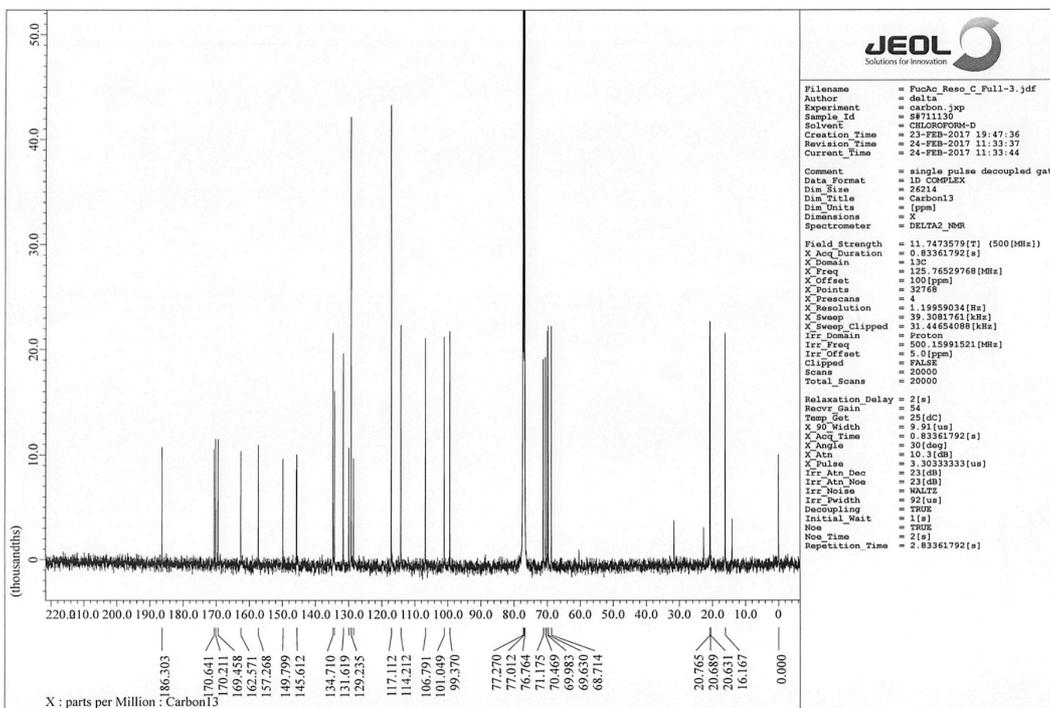


Figure 39. 蛍光基質 **8** の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 **9** の合成

化合物 **28** (0.11 g, 0.28 mmol) を脱水 THF 20 mL に溶解し、ADDP (0.42 g, 1.67 mmol)、TBP (420 μ L, 1.67 mmol)、TFMU (80.0 mg, 0.33 mmol) を加え、窒素雰囲気下、40 °C で 20 分攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、250 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 250 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で精製することで、蛍光基質 **9** (0.16 g, 93.6%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₂₉H₂₇F₃O₁₁: C, 57.24; H, 4.47; F, 9.37; N, 0.00.

Found: C, 57.53; H, 4.63; F, 9.33; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 631$ [M + Na]⁺, (negative mode): $m/z = 607$ [M - H]⁻.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (d, 3H, $J_{5-6}=6.5$ Hz, H-6), 2.02 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.06 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.21 (s, 3H, -CH₃, OAc), 3.98 (qd, 1H, H-5), 5.06 (d, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1), 5.09-5.13 (m, 3H, H-3 and benzyl position), 5.31 (d, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=3.5$ Hz, H-4), 5.48 (dd, 1H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, $J_{2-3}=10.0$ Hz, H-2), 6.63 (s, 1H), 6.93 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 6.98 (dd, 1H, $J=2.8$ Hz and 9.3 Hz), 7.04 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J=9.5$ Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.17 (C6), 20.67 (-CH₃, Ac), 20.73 (-CH₃, Ac), 20.80 (-CH₃, Ac), 68.62 (C2), 69.57 (C5), 69.93 (C4), 70.21 (benzyl position), 71.15 (C3), 99.32 (C1), 102.32, 107.21, 112.33, 112.37, 114.03, 117.07, 126.40, 129.24, 129.86, 141.57 (q, -C-CF₃), 156.22, 157.22, 159.40, 162.45 (-C=O, TFMU), 169.52 (-C=O, Ac), 170.25 (-C=O, Ac), 170.68 (-C=O, Ac).

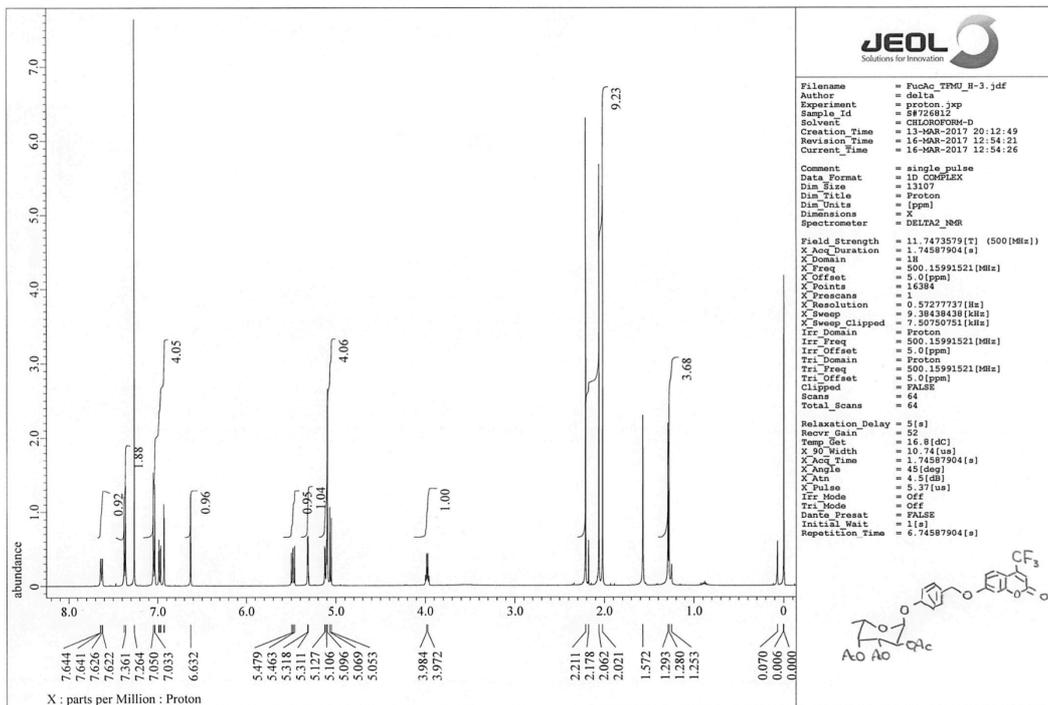


Figure 40. 蛍光基質 9 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

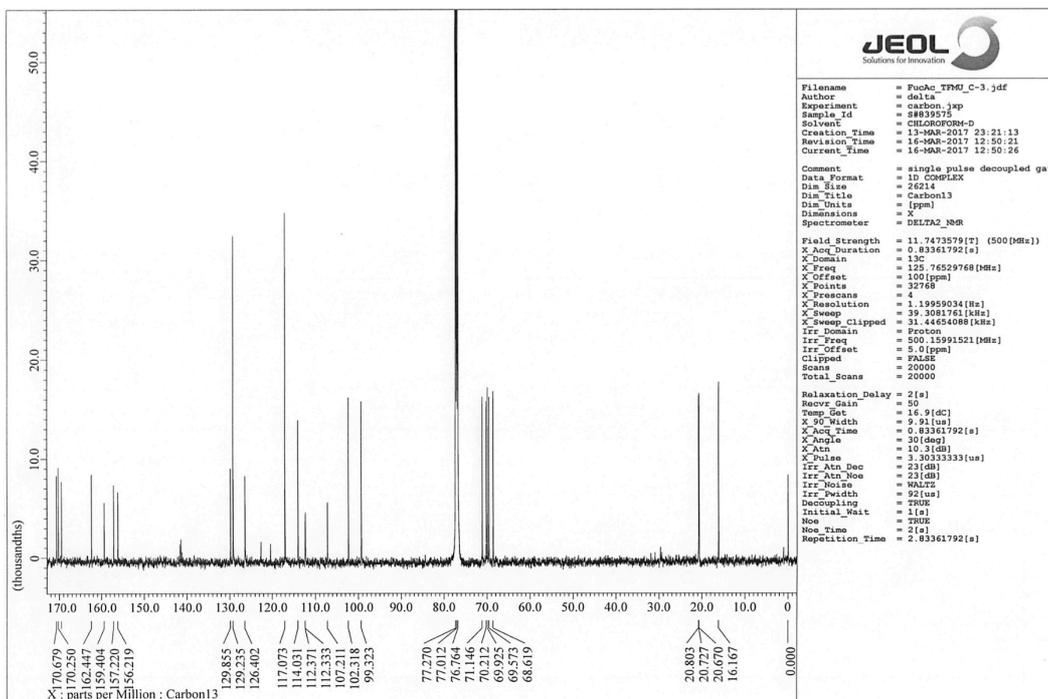


Figure 41. 蛍光基質 9 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

蛍光基質 **10** の合成

化合物 **28** (0.14 g, 0.36 mmol) を脱水 THF 30 mL に溶解し、ADDP (0.56 g, 2.18 mmol)、TBP (540 μ L, 2.18 mmol)、2MeTG (0.14 g, 0.44 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌し反応を終了した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 1 : 5) で精製することで、蛍光基質 **10** (0.22 g, 87.3%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₉H₃₆F₃O₁₁: C, 68.81; H, 5.33; N, 0.00. Found: C, 68.83; H, 5.26; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 703$ [M + Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (d, 3H, $J_{5,6}=6.0$ Hz, H-6), 2.02 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.06 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.07 (s, 3H, -CH₃, OAc), 2.21 (s, 3H, -CH₃, 2MeTG), 3.98 (qd, 1H, H-5), 5.08 (d, 1H, $J_{1,2}=8.0$ Hz, H-1), 5.10-5.13 (m, 3H, H-3 and benzyl position), 5.31 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.3$ Hz, $J_{4,5}=1.3$ Hz, H-4), 5.48 (dd, 1H, $J_{1,2}=8.0$ Hz, $J_{2,3}=10.0$ Hz, H-2), 6.46 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.57 (dd, 1H, $J=1.8$ Hz, 9.8 Hz), 6.82 (dd, 1H, $J=2.3$ Hz and 8.8 Hz), 6.95 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J=9.5$ Hz), 7.02 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 7.05 (d, 2H, $J=9.0$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.37-7.40 (m, 4H), 7.45 (dd, 1H, $J=1.0$ Hz and 7.5 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.16 (C6), 19.65 (-CH₃, 2MeTG), 20.67 (-CH₃, Ac), 20.73 (-CH₃, Ac), 20.79 (-CH₃, Ac), 68.61 (C2), 69.57 (C5), 69.90 (C4), 70.28 (benzyl position), 71.13 (C3), 99.27 (C1), 101.23, 105.81, 114.00, 114.50, 117.02, 118.33, 126.11, 129.05, 129.29, 129.45, 129.49, 129.92, 130.16, 130.57 (x2), 132.45, 136.15, 149.32, 154.52, 157.19, 158.88, 163.20, 169.50 (-C=O, Ac), 170.25 (-C=O, Ac), 170.67 (-C=O, Ac), 185.82 (-C=O, 2MeTG).

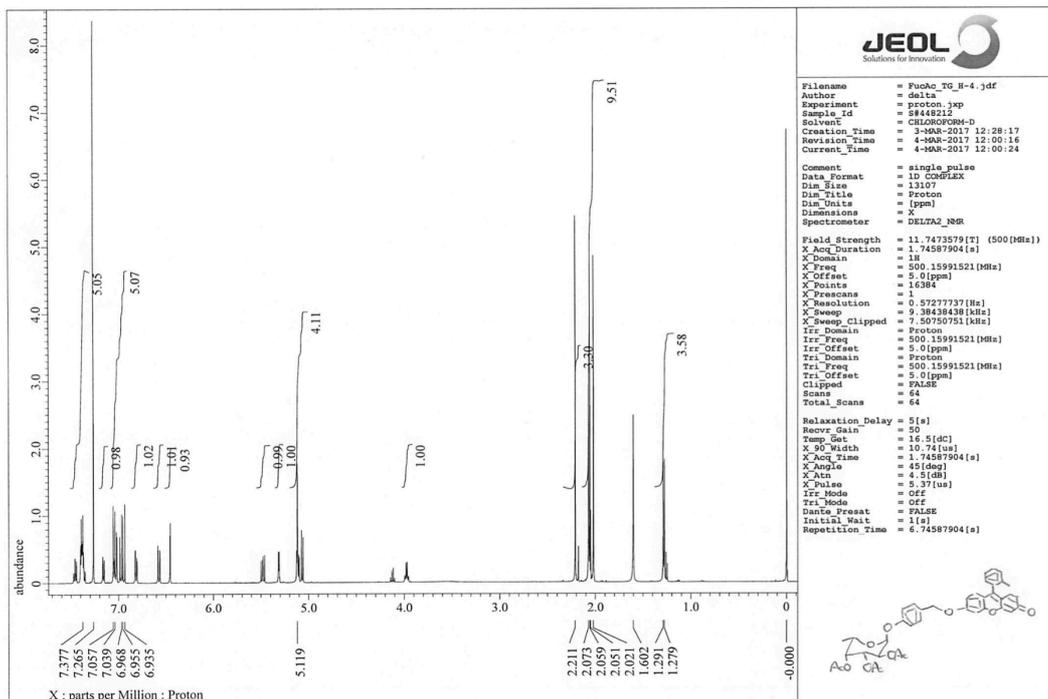


Figure 42. 蛍光基質 **10** の ^1H -NMR スペクトル

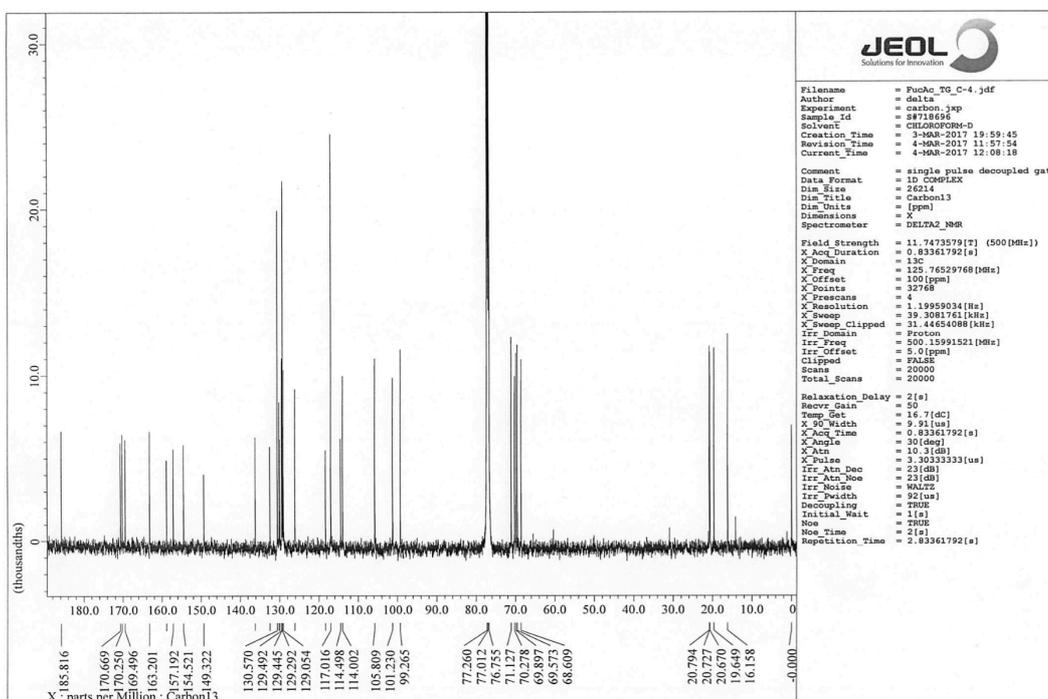


Figure 43. 蛍光基質 **10** の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 **11** の合成

蛍光基質 **8** (0.11 g, 0.14 mmol) を溶媒 (MeOH: CH₂Cl₂ = 5: 1) 60 mL に溶解し、反応液を 0 °C としたのち、28 % Sodium Methoxide Methanol Solution (95 μL) を加え、0 °C で 17 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の H₂O に注ぎ、250 mL の ethyl acetate で 3 回抽出後、500 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 8 : 1) で精製することで、蛍光基質 **11** (0.072 g, 88.0%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₂₅H₂₃NO₈: C, 64.51; H, 4.98; N, 3.01. Found: C, 64.05; H, 5.53; N, 2.89.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 488$ [M + Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.11 (d, 3H, $J_{5-6}=6.5$ Hz, H-6), 3.44-3.57 (m, 3H, H-2, H-3, and H-4), 3.74 (qd, 1H, H-5), 4.57 (d, 1H, -OH), 4.83-4.84 (m, 2H, $J_{1-2}=8.0$ Hz, H-1 and -OH), 5.16 (d, 1H, -OH), 5.19 (s, 1H benzyl position), 6.26 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.77 (dd, 1H, $J=1.8$ Hz and 9.8 Hz), 7.02 (d, 1H, $J=9.0$ Hz), 7.10 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz and 9.0 Hz), 7.18 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 7.41 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.52 (d, 1H, $J=9.5$ Hz), 7.76 (d, 1H, $J=9.0$ Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 16.68 (C6), 69.93, 70.12 (benzyl position), 70.32 (C5), 71.00, 73.45, 100.47 (C1), 101.21, 105.70, 114.50, 116.19, 128.02, 129.02, 129.79, 131.41, 133.79, 135.01, 145.24, 145.32, 149.84, 157.46, 162.46, 185.47 (-C=O, resorufin).

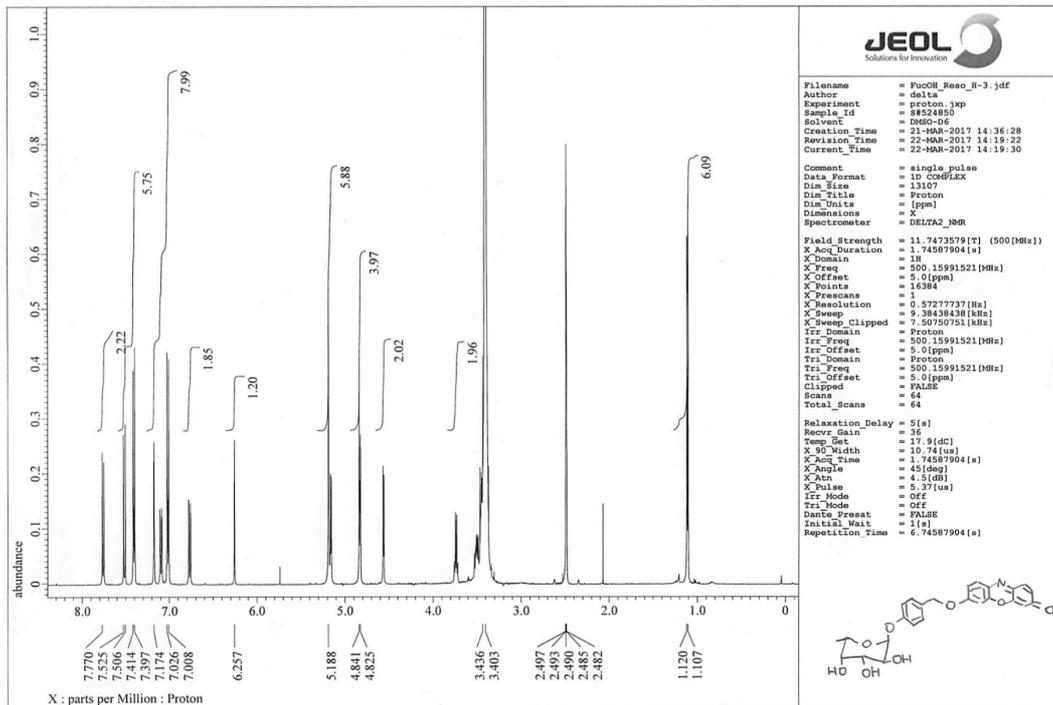


Figure 44. 蛍光基質 **11** の ^1H -NMR スペクトル

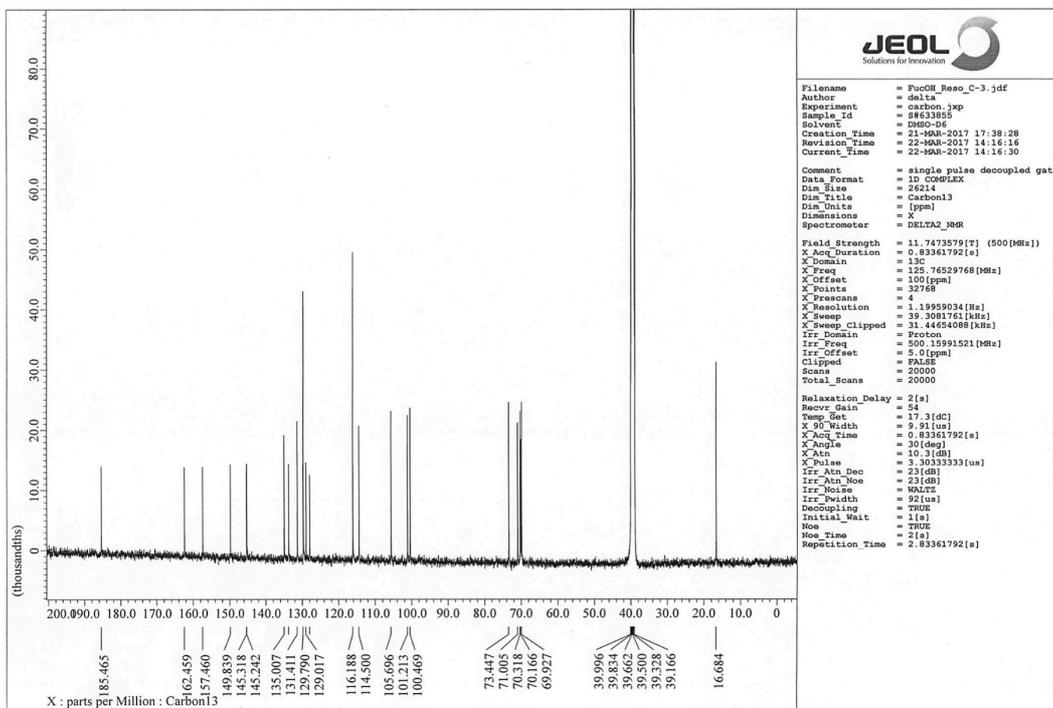


Figure 45. 蛍光基質 **11** の ^{13}C -NMR スペクトル

蛍光基質 **12** の合成

蛍光基質 **9** (62.0 mg, 0.10 mmol) を MeOH 3 mL に溶解し、28 % Sodium Methoxide Methanol Solution (50 μ L) を加え、室温で 25 分間攪拌し反応を終了した。反応液に DOWEX 50W-X8 (H^+ form) を加え中和およびろ過したのち、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 :MeOH=10:1) で精製することで、蛍光基質 **12** (36.0 mg, 73.3%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for $C_{21}H_{23}F_3O_8$: C, 57.26; H, 4.39; F, 11.81; N, 0.00. Found: C, 57.27; H, 4.36; F, 11.86; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 505$ [$M + Na$] $^+$, (negative mode): $m/z = 481$ [$M - H$] $^-$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.11 (d, 3H, $J_{5,6}=6.0$ Hz, H-6), 3.37-3.53 (m, 3H, H-2, H-3, and H-4), 3.74 (qd, 1H, H-5), 4.56 (d, 1H, -OH), 4.83 (d, 2H, $J_{1,2}=7.0$ Hz, H-1 and -OH), 5.16 (d, 1H, -OH), 5.17 (s, 2H, benzyl position), 6.84 (s, 1H), 7.01 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.10 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz and 9.0 Hz), 7.23 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 7.40 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J=7.5$ Hz). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 16.68 (C6), 69.88, 69.93 (benzyl position), 70.31 (C5), 71.02, 73.44, 100.48 (C1), 102.62, 106.57, 113.37, 114.10, 116.18, 121.81, 125.93, 129.02, 129.75, 139.48 (q, - \underline{C} -CF $_3$), 155.88, 157.44, 158.87, 162.18 (- \underline{C} =O, TFMU).

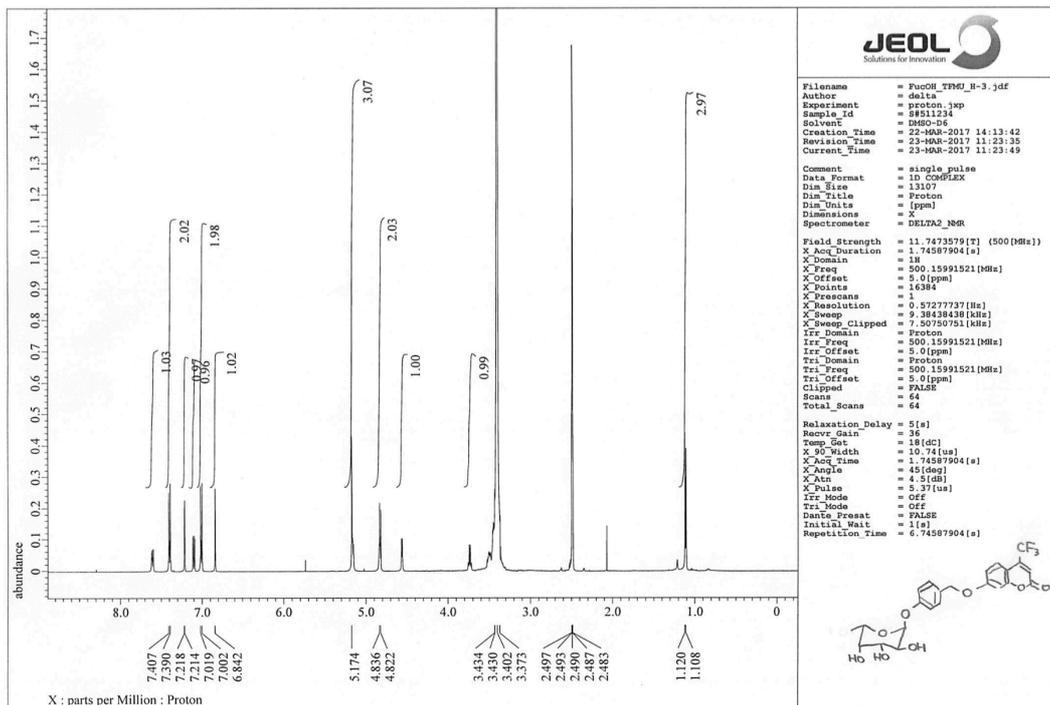


Figure 46. 蛍光基質 12 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

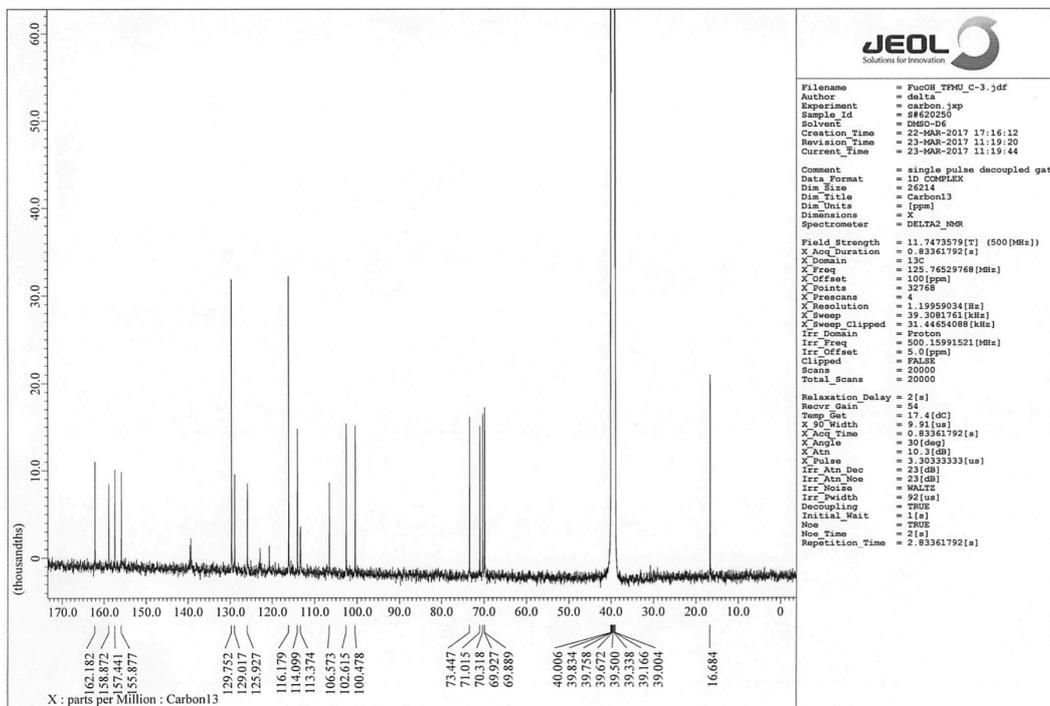


Figure 47. 蛍光基質 12 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

蛍光基質 **13** の合成

蛍光基質 **10** (0.11 g, 0.16 mmol) を MeOH 15 mL に溶解し、反応液を 0 °C としたのち、28 % Sodium Methoxide Methanol Solution (15 μ L) を加え、0 °C で 12 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 120 mL の H₂O に注ぎ、120 mL の ethyl acetate で 3 回抽出後、200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 8 : 1) で精製することで、蛍光基質 **13** (63.0 mg, 72.3%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for C₃₃H₃₀O₈: C, 71.47; H, 5.45; N, 0.00. Found: C, 71.46; H, 5.64; N, 0.00.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 555$ [M + H]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.12 (d, 3H, $J_{5-6}=7.0$ Hz, H-6), 2.00 (s, 3H, -CH₃, 2MeTG), 3.36-3.53 (m, 3H, H-2, H-3, and H-4), 3.74 (qd, 1H, H-5), 4.52 (d, 1H, -OH), 4.79 (d, 1H, -OH), 4.83 (d, 1H, $J_{1-2}=7.0$ Hz, H-1), 5.12 (d, 1H, -OH), 5.19 (s, 2H, benzyl position), 6.24 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.43 (dd, 1H, $J=1.8$ Hz and 9.8 Hz), 6.84 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 6.89 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 6.98 (dd, 1H, $J=2.5$ Hz and 8.5 Hz), 7.02 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.26 (d, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.30 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 7.40 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.40-7.52 (m, 3H).
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 16.61 (C6), 19.12 (-CH₃, 2MeTG), 69.91, 70.04 (benzyl position), 70.28 (C5), 70.98, 73.43, 100.50 (C1), 101.57, 104.78, 113.78, 114.41 (x2), 116.19, 117.34, 126.23, 128.98, 129.07, 129.24, 129.56, 129.68, 130.51 (x2), 132.10, 135.64, 149.02, 153.98, 157.42, 158.42, 163.29, 184.05 (-C=O, 2MeTG).

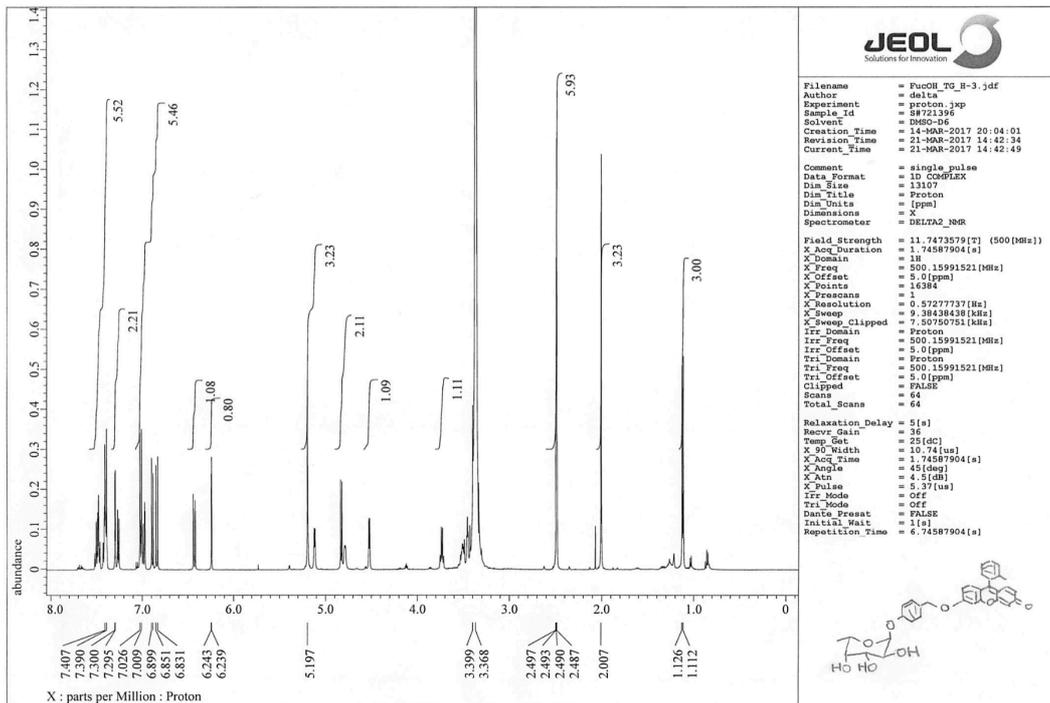


Figure 48. 蛍光基質 **13** の ^1H -NMR スペクトル

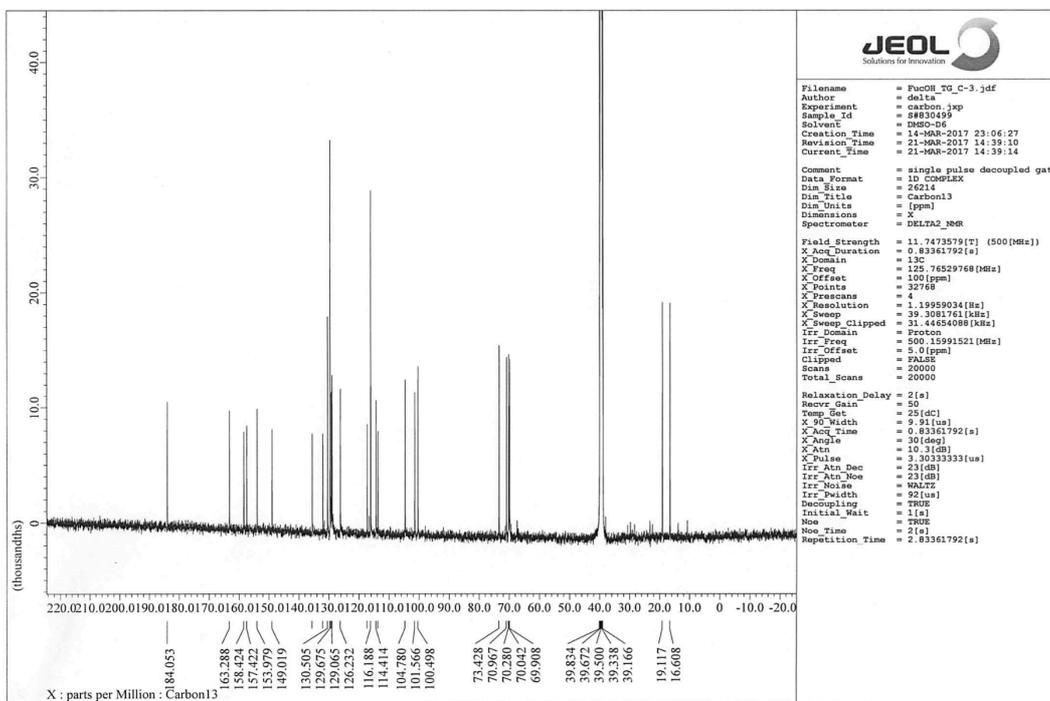


Figure 49. 蛍光基質 **13** の ^{13}C -NMR スペクトル

4-5-5. 光親和性プローブの合成

化合物 **29** の合成

Potassium carbonate (和光純薬工業, 166-25392, 23.00 g, 166.41 mmol) に脱水 acetone 50 mL に溶解した phenol (和光純薬工業, 161-01025, 5.04 g, 53.554 mmol) を加え、続いて propargylbromide 80 % in Toluene, ca. 9.2 mol/L (東京化成工業, P1272, 7.00 mL, 64.00 mmol) を加えたのち、窒素雰囲気下、室温で 18 時間攪拌し反応を終了した。反応液をろ過したのち、トルエンを加え減圧下で 3 回溶媒を共沸させ、化合物 **29** (6.73 g, 95.2%) を得た。

化合物 **30** の合成

AlCl₃ (Sigma-Aldrich, 563919, 2.02 g, 15.15 mmol) に脱水 CH₂Cl₂ 30 mL を加え、反応液を 0 °C としたのち、脱水 CH₂Cl₂ 10 mL に溶解した terephthaloylchloride (東京化成工業, T0017, 6.95 g, 34.23 mmol) および脱水 CH₂Cl₂ 10 mL に溶解した化合物 **29** (1.82 g, 13.78 mmol) を加え、窒素雰囲気下、0 °C で 1 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ice water に注ぎ、200 mL の ethyl acetate で 2 回抽出後、400 mL の H₂O、400 mL の飽和 NaCl 溶液および 400 mL の 1 M KHSO₄ 水溶液で洗浄したのち、Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、hexane/ethyl acetate で再結晶を行うことで化合物 **30** (2.57 g, 66.6%) を得た。

化合物 **31** の合成

D-Galactose (和光純薬工業, 071-00032, 2.01 g, 11.2 mmol) を pyridine 10 mL に溶解し、Ac₂O (8.0 mL, 84.6 mmol) を加え、室温で 19 時間攪拌し反応を終了した。反応液を 200 mL の ethyl acetate に注ぎ、200 mL の 1 M HCl 水溶液、200 mL の飽和 NaHCO₃ 溶液および 200 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na₂SO₄ を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムク

ロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で精製することで、化合物 **24** (4.27 g, 98.0%) を得た。

化合物 **32** の合成

化合物 **31** (1.35 g, 3.45 mmol) を脱水 CHCl_3 10 mL に溶解し、4-nitrothiophenol (東京化成工業, N0146, 0.65 g, 4.19 mmol) および $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (2.4 mL, 19.50 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で2日間攪拌し反応を終了した。反応液を250 mL の ethyl acetate に注ぎ、250 mL の飽和 NaHCO_3 溶液、250 mL の H_2O および 250 mL の飽和 NaCl 溶液で洗浄したのち、無水 Na_2SO_4 を加え反応液を脱水した。その後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : ethyl acetate = 1 : 1) で精製することで、化合物 **32** (0.57 g, 34.0%) を得た。

化合物 **33** の合成

化合物 **32** を EtOH 20 mL に溶解し、 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20 wt.% loading (Sigma-Aldrich, 330094, 70.4 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で3時間攪拌し反応を終了した。反応液をろ過したのち、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 2) で精製することで、化合物 **32** (0.12 g, 64.0%) を得た。

化合物 **34** の合成

化合物 **30** (82.6 mg, 0.29 mmol) を脱水 THF 10 mL に溶解し、化合物 **34** (0.11 g, 0.24 mmol)、HOObt (東京化成工業, D2039, 67.2 mg, 0.41 mmol) および DCC (東京化成工業, D0436, 77.3 mg, 0.37 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で3時間攪拌し反応を終了した。反応液を減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1 : 2) で精製することで、化合物 **34** (0.13 g, 75.0%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{NO}_{12}\text{S}$: C, 61.92; H, 4.92; N, 1.95. Found: C, 61.92; H, 4.83; N, 1.89.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 718 [M + H]^+$ and $740 [M + Na]^+$. ESI-MS (negative mode): $m/z = 716 [M - H]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz CDCl_3): δ 1.98 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 2.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 2.12 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 2.14 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 2.58 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz, $-\text{CCH}$), 3.94 (ddd, 1H, $J_{5-6a} = 6.5$ Hz, $J_{5-6b} = 7.0$ Hz, H-5), 4.13 (dd, $J_{5-6a} = 6.5$ Hz, $J_{6a-6b} = 11.5$ Hz, H-6a), 4.20 (dd, 1H, $J_{5-6b} = 7.0$ Hz, $J_{6a-6b} = 11.5$ Hz, H-6b), 4.68 (d, 1H, $J_{1-2} = 9.5$ Hz, H-1), 4.80 (d, 2H, $J = 3.0$ Hz, $-\text{O-CH}_2\text{-CCH}$), 5.06 (dd, 1H, $J_{2-3} = 10.0$ Hz, $J_{3-4} = 3.5$ Hz, H-3), 5.23 (dd, 1H, $J_{1-2} = J_{2-3} = 9.8$ Hz, H-2), 5.42 (dd, 1H, $J_{3-4} = 3.5$ Hz, H-4), 7.07 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.57 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.66 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.84 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.86 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.97 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 20.49 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.58 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.63 ($-\text{CH}_3$, Ac), 20.78, ($-\text{CH}_3$, Ac), 55.83 ($-\text{OCH}_2\text{CCH}$), 61.47 (C6), 67.09 (C2 and C4), 71.89 (C3), 74.36 (C5), 76.22 ($-\text{CCH}$), 77.53 ($-\text{CCH}$), 86.67 (C1), 114.57, 120.33, 126.89, 127.59, 129.95, 130.15, 132.42, 134.13, 137.39, 137.93, 141.12, 161.36 ($-\text{COCH}_2\text{CCH}$), 164.76 ($-\text{NH-C=O}$), 169.33 ($-\text{C=O}$, Ac), 169.96 ($-\text{C=O}$, Ac), 170.11 ($-\text{C=O}$, Ac), 170.31 ($-\text{C=O}$, Ac), 194.38 ($-\text{C=O}$, benzophenone).

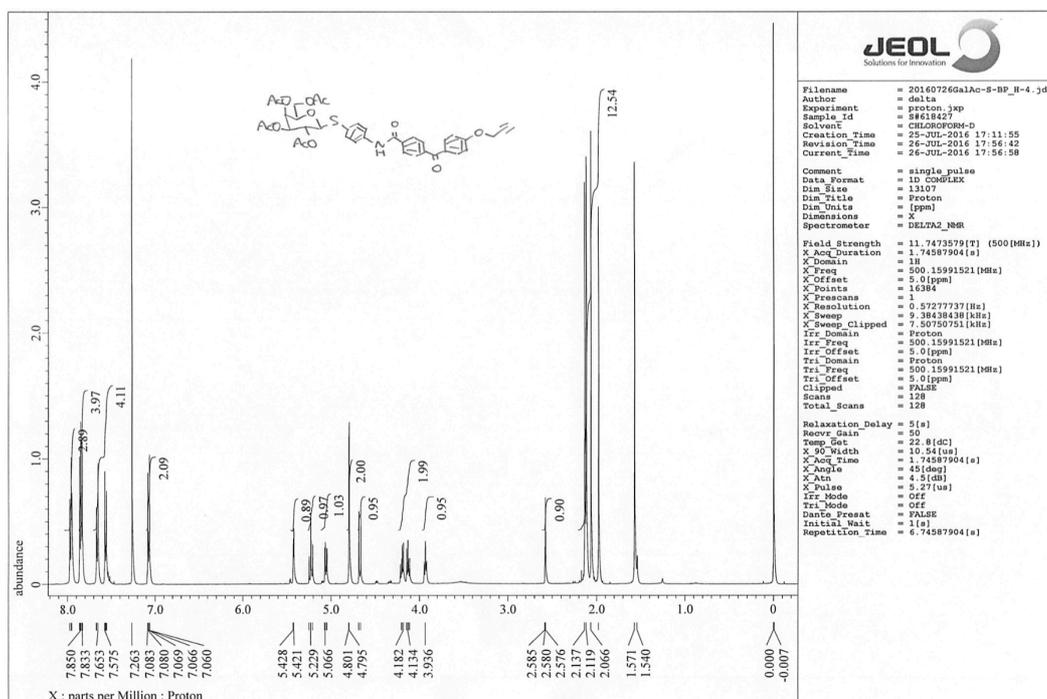


Figure 50. 化合物 34 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

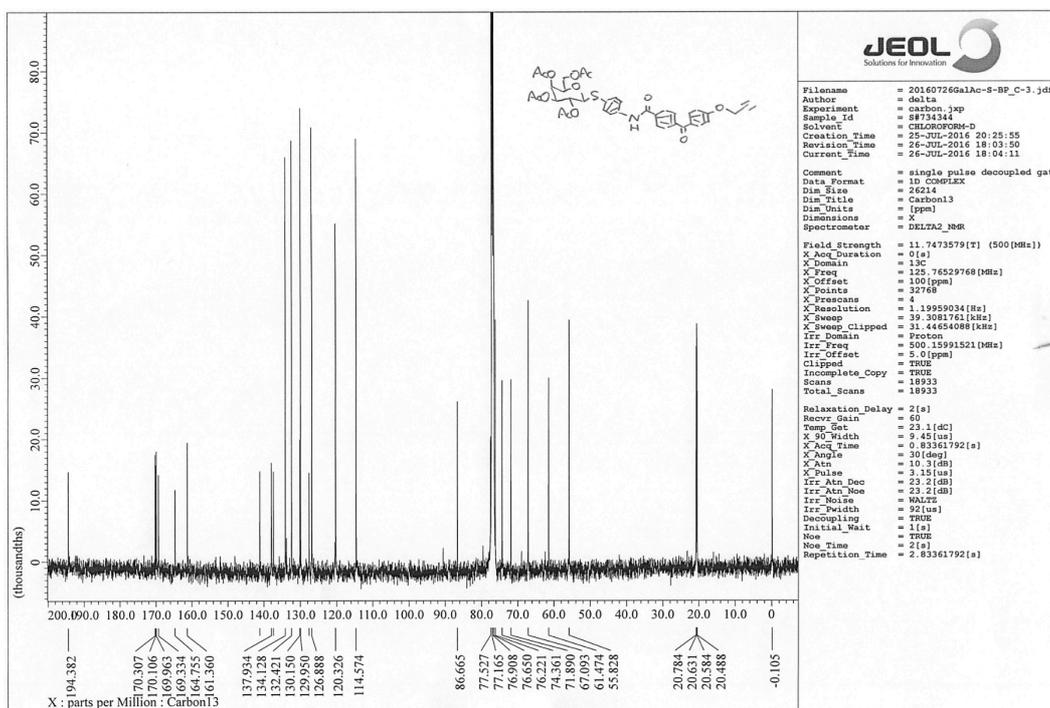


Figure 51. 化合物 **34** の ^{13}C -NMR スペクトル

光親和性プローブ **14** の合成

化合物 **34** (76.8 mg, 0.10 mmol) を MeOH 10 mL に溶解し、triethylamine (1 mL) および H_2O (1 mL) を加え、室温で 6 時間攪拌し反応を終了した。減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 5 : 1) で精製することで、光親和性プローブ **14** (43.1 mg, 75.0%) を得た。

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}$: C, 63.38; H, 4.95; N, 2.55; S, 5.83. Found: C, 63.36; H, 5.20; N, 2.73; S, 5.68.

ESI-MS (positive mode): $m/z = 572$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ESI-MS (negative mode): $m/z = 548$ $[\text{M} - \text{H}]^-$.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*6): δ 3.33 (m, 2H, H-3 and H-5), 3.39-3.42 (m, 1H, $J_{1-2} = 9.3$ Hz H-2), 3.43-3.47 (dd, 1H, H-6a), 3.48-3.54 (m, 1H, $J_{6a-6b} = 11.5$ Hz, H-6b), 3.67 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz, -CCH), 3.71 (dd, 1H, $J_{3-4} = J_{4-5} = 3.5$ Hz, H-4), 4.48 (d, 1H, $J_{4-\text{OH}} = 4.0$ Hz, OH-4), 4.51 (d, 1H, $J_{1-2} = 9.5$ Hz, H-1), 4.65 (dd, 1H, $J_{6a-\text{OH}} = J_{6b-\text{OH}} = 5.3$ Hz, OH-6),

4.90 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, OH-3), 4.95 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, -OCH₂CCH), 5.13 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, OH-2), 7.12 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.48 (d, 2H, $J = 9.5$ Hz), 7.75 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.79 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.83 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.09 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 10.48 (s, 1H, -NH-CO-). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.68 (-OCH₂CCH), 60.48 (C6), 68.25 (C4), 69.10 (C5), 74.60 (C3), 78.55 (-CCH), 78.75 (-CCH), 79.10 (C2), 88.07 (C1), 114.74, 120.52, 127.68, 129.10, 129.40, 129.60, 130.68, 132.05, 137.54, 137.67, 140.05, 160.99 (-COCH₂CCH), 164.72 (-NH-C=O), 193.88 (-C=O, benzophenone).

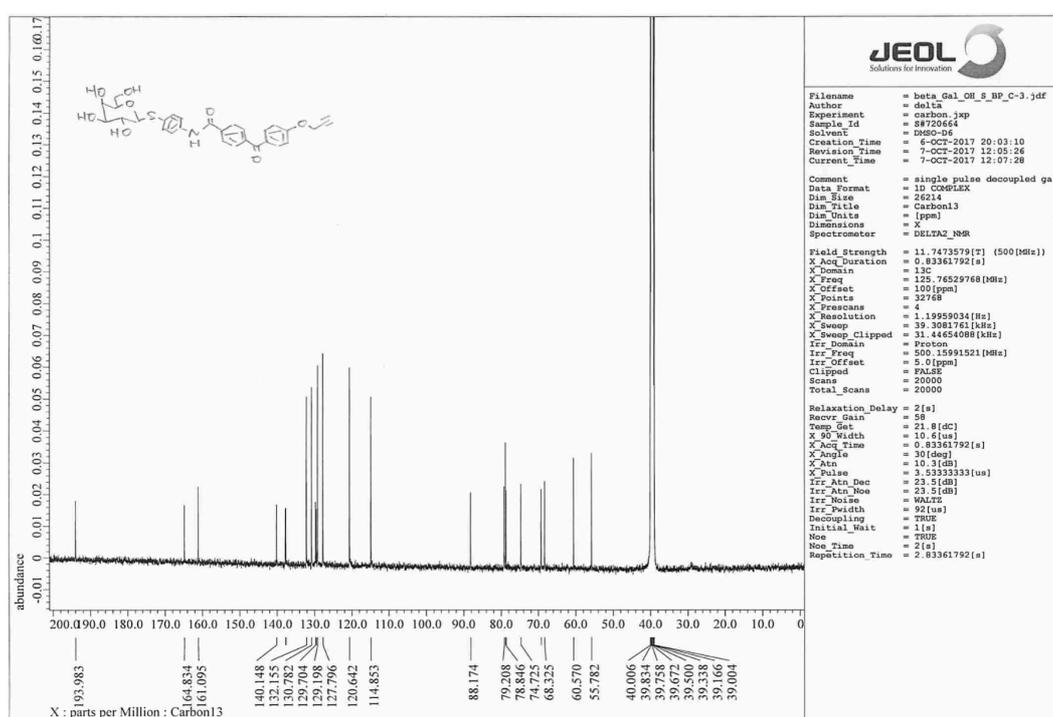


Figure 52. 光親和性プローブ **14** の ¹H-NMR スペクトル

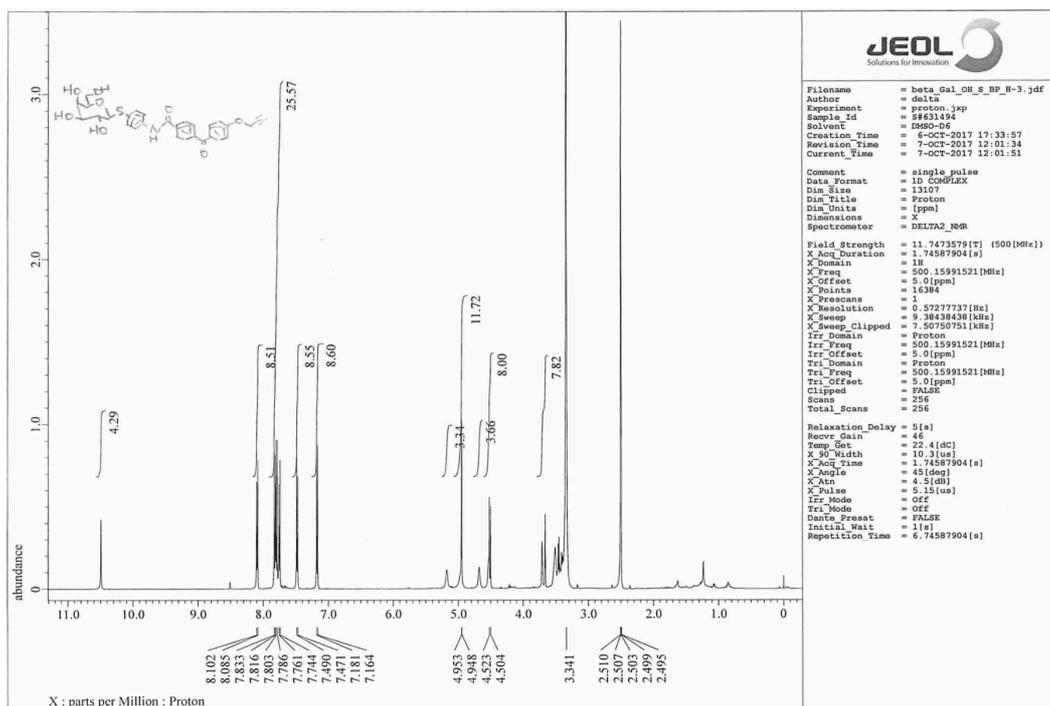


Figure 53. 光親和性プローブ **14** の ¹³C-NMR スペクトル

4-6. 蛍光基質 1-13 の蛍光スペクトル

蛍光基質および蛍光色素の蛍光スペクトルは蛍光分光光度 (RF-5300PC, SHIMADZU) を用いて測定した。

4-6-1. 蛍光基質 1-3 溶液および蛍光色素溶液の調製

蛍光基質 **1** (molecular weight: 648.62) 1.0 mg を DMSO 154 μ L に溶解し、10 mM 蛍光基質 **1** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 蛍光基質 **1** 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 蛍光基質 **1** 溶液を作製した。

蛍光基質 **2** (molecular weight: 665.57) 1.0 mg を DMSO 150 μ L に溶解し、10 mM

蛍光基質 **2** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 蛍光基質 **2** 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 40 μ L と PBS 3960 μ L を混合し、100 nM 蛍光基質 **1** 溶液を作製した。

蛍光基質 **3** (molecular weight: 737.76) 1.0 mg を DMSO 136 μ L に溶解し、10 mM 蛍光基質 **3** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 蛍光基質 **3** 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 蛍光基質 **3** 溶液を作製した。

Resorufin (molecular weight: 213.19) 1.0 mg を DMSO 469 μ L に溶解し、10 mM resorufin 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M resorufin 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM resorufin 溶液を作製した。

TFMU (molecular weight: 230.14) 1.0 mg を DMSO 435 μ L に溶解し、10 mM TFMU 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M TFMU 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 40 μ L と PBS 3960 μ L を混合し、100 nM TFMU 溶液を作製した。

2MeTG (molecular weight: 304.34) 1.0 mg を DMSO 329 μ L に溶解し、10 mM 2MeTG 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 2MeTG 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 2MeTG 溶液を作製した。

4-6-2. 蛍光基質 **1-3** 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定

調製した蛍光基質 **1-3** 溶液および蛍光色素溶液について、10 nM 蛍光基質 **1** および resorufin 溶液は励起波長 571 nm、100 nM 蛍光基質 **2** および TFMU 溶液は励起波長 385 nm、10 nM 蛍光基質 **3** および 2MeTG 溶液は励起波長 491 nm 条件下で蛍光スペクトルを測定した。

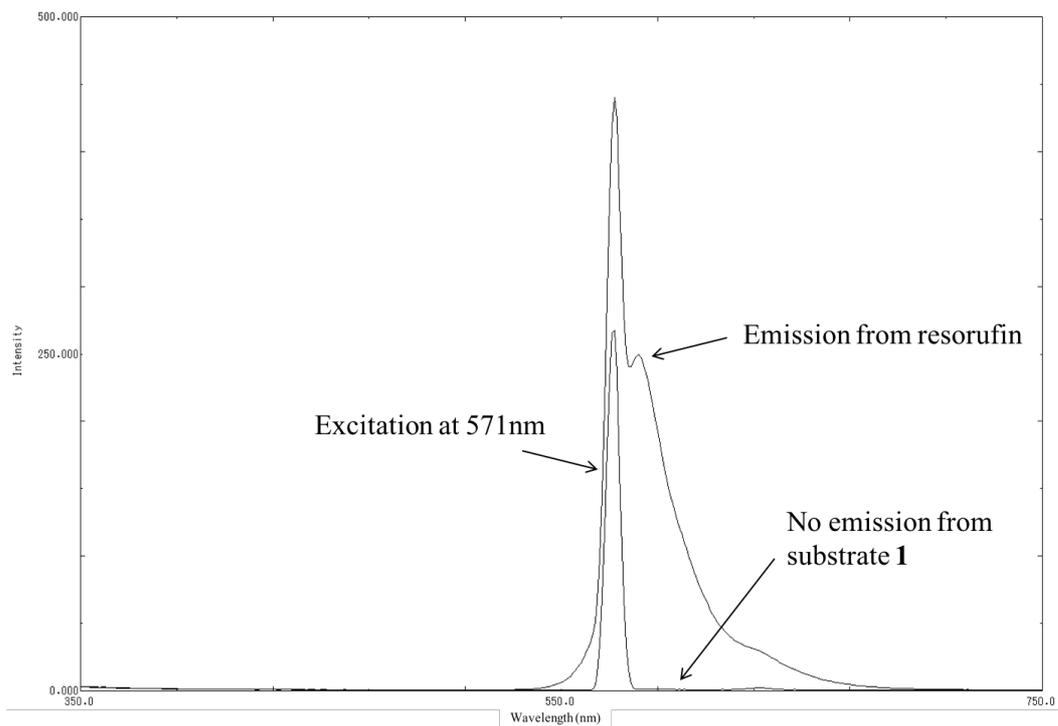


Figure 54. 蛍光基質 1 および resorufin の蛍光スペクトル

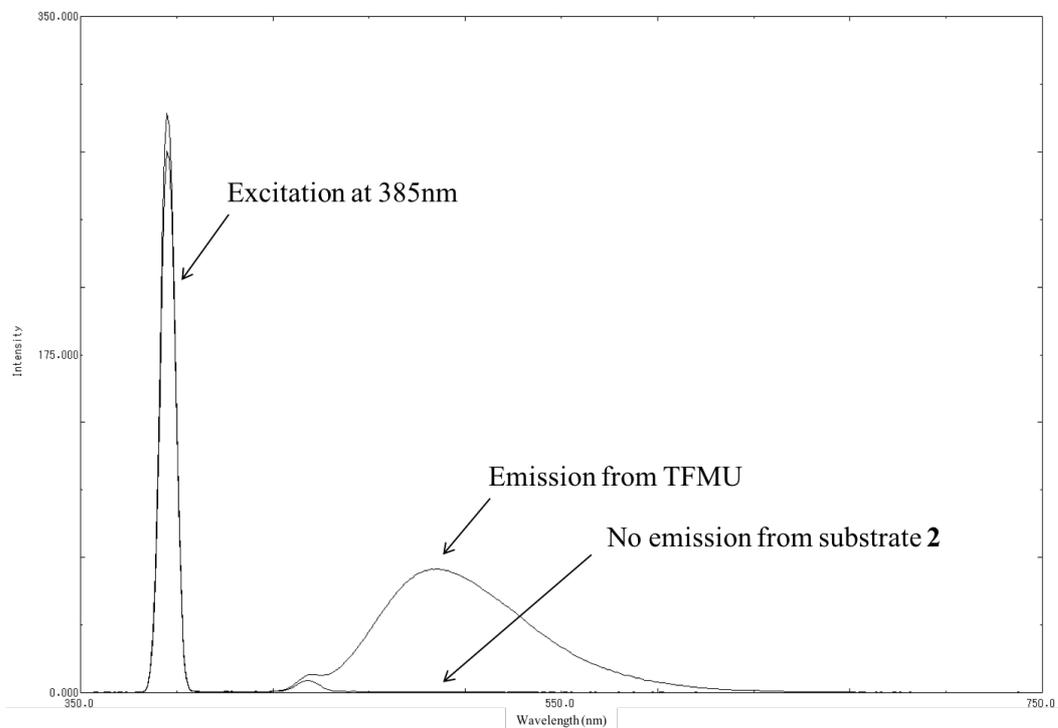


Figure 55. 蛍光基質 2 および TFMU の蛍光スペクトル

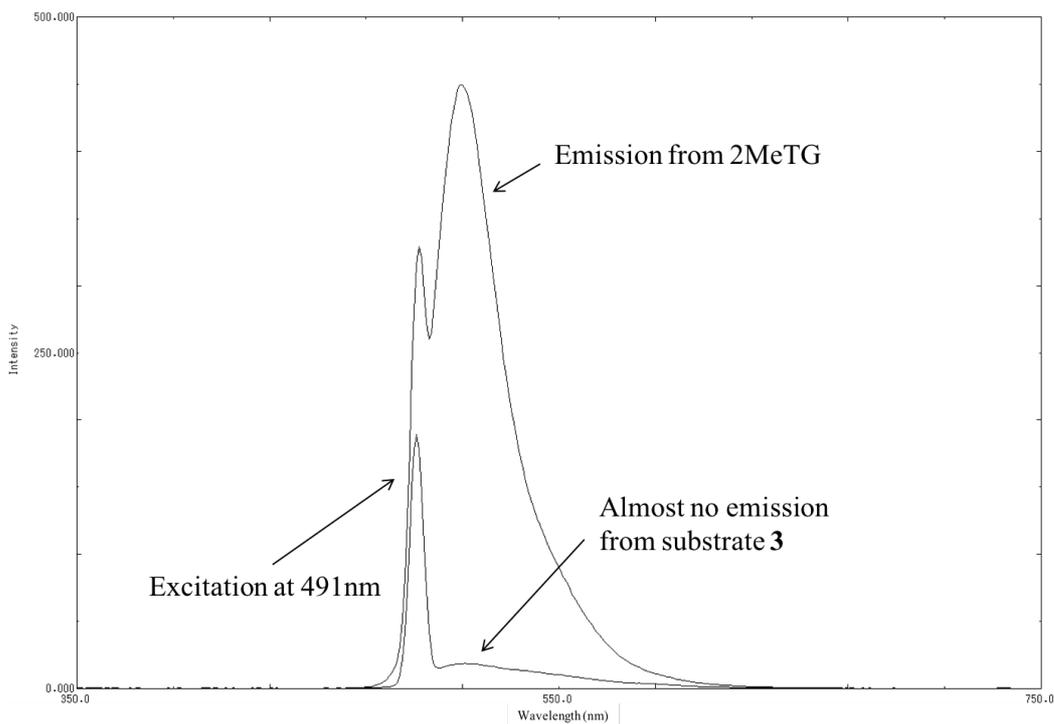


Figure 56. 蛍光基質 3 および 2MeTG の蛍光スペクトル

4-6-3. 蛍光基質 4-7 溶液および蛍光色素溶液の調製

蛍光基質 4 (molecular weight: 649.60) 1.0 mg を DMSO 154 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 4 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 4 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 nM 蛍光基質 4 溶液を作製した。

蛍光基質 5 (molecular weight: 666.56) 1.0 mg を DMSO 150 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 5 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 5 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 40 μL と PBS 3960 μL を混合し、100 nM 蛍光基質 5 溶液を作製した。

蛍光基質 6 (molecular weight: 738.74) 1.0 mg を DMSO 135 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 6 溶液を作製した。次に、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 6 溶液を作製した。また、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を

混合し、10 nM 蛍光基質 **6** 溶液を作製した。さらに、10 nM の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 pM 蛍光基質 **6** 溶液を作製した。

蛍光基質 **7** (molecular weight: 570.59) 1.0 mg を DMSO 175 μ L に溶解し、10 mM 蛍光基質 **7** 溶液を作製した。次に、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 蛍光基質 **7** 溶液を作製した。また、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 蛍光基質 **7** 溶液を作製した。さらに、10 nM の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 pM 蛍光基質 **7** 溶液を作製した。

Resorufin (molecular weight: 213.19) 1.0 mg を DMSO 469 μ L に溶解し、10 mM resorufin 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M resorufin 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM resorufin 溶液を作製した。

TFMU (molecular weight: 230.14) 1.0 mg を DMSO 435 μ L に溶解し、10 mM TFMU 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M TFMU 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 40 μ L と PBS 3960 μ L を混合し、100 nM TFMU 溶液を作製した。

2MeTG (molecular weight: 304.34) 1.0 mg を DMSO 329 μ L に溶解し、10 mM 2MeTG 溶液を作製した。次に、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 2MeTG 溶液を作製した。また、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 2MeTG 溶液を作製した。さらに、10 nM の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 pM 2MeTG 溶液を作製した。

4-6-4. 蛍光基質 **4-7** 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定

調製した蛍光基質 **4-7** 溶液および蛍光色素溶液について、10 nM 蛍光基質 **4** および resorufin 溶液は励起波長 571 nm、100 nM 蛍光基質 **5** および TFMU 溶液は励起波長 385 nm、10 pM 蛍光基質 **6, 7** および 2MeTG 溶液は励起波長 491 nm 条件下で蛍光スペクトルを測定した。

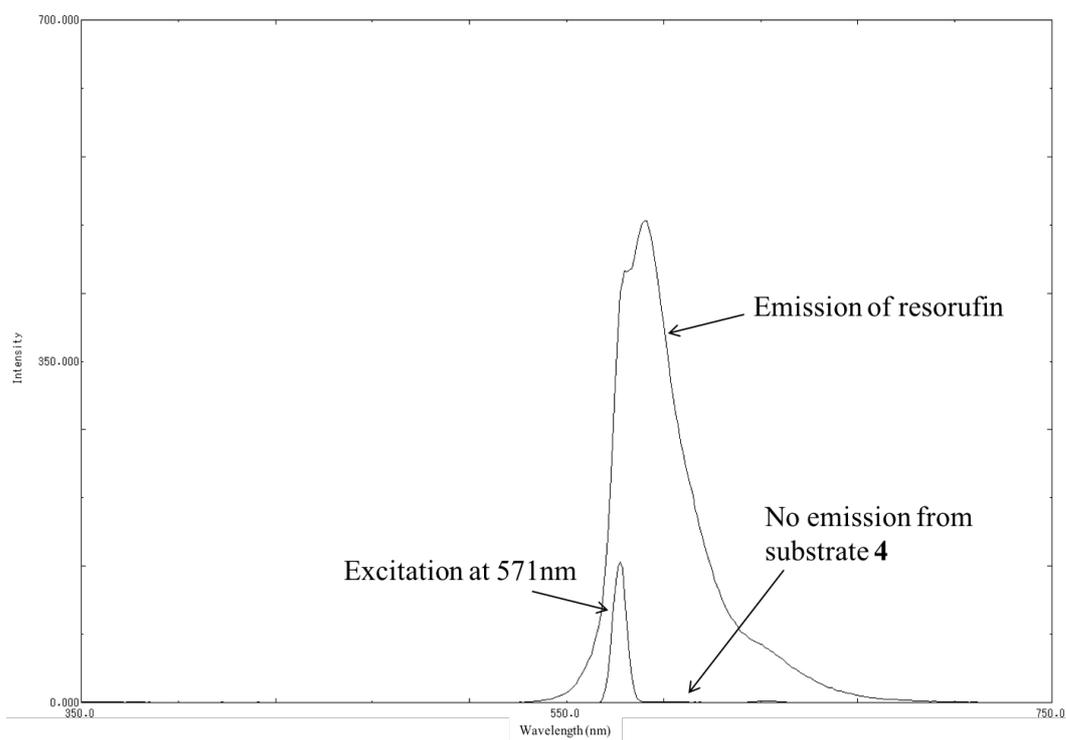


Figure 57. 蛍光基質 4 および resorufin の蛍光スペクトル

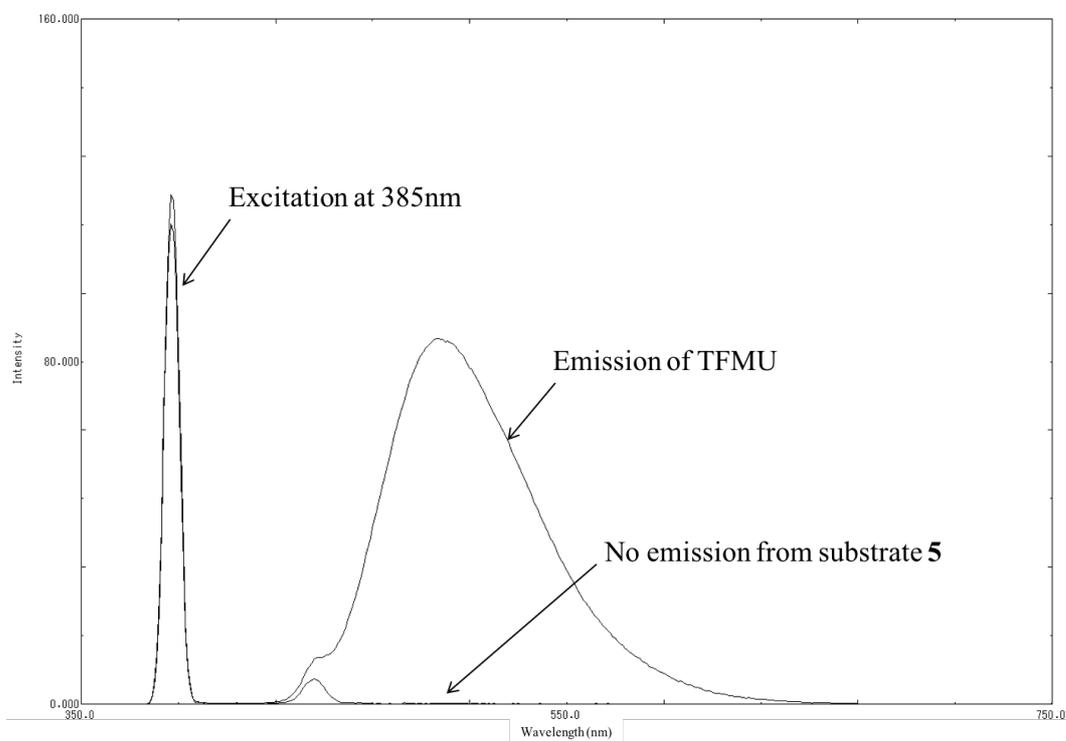


Figure 58. 蛍光基質 5 および TFMU の蛍光スペクトル

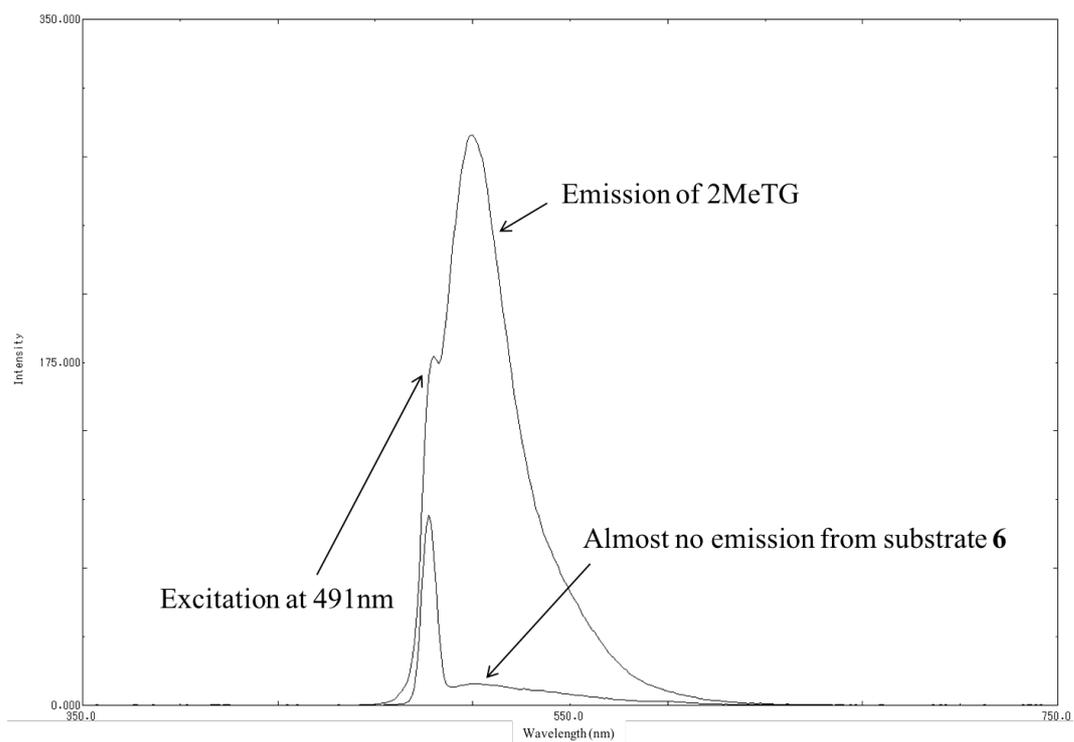


Figure 59. 蛍光基質 6 および 2MeTG の蛍光スペクトル

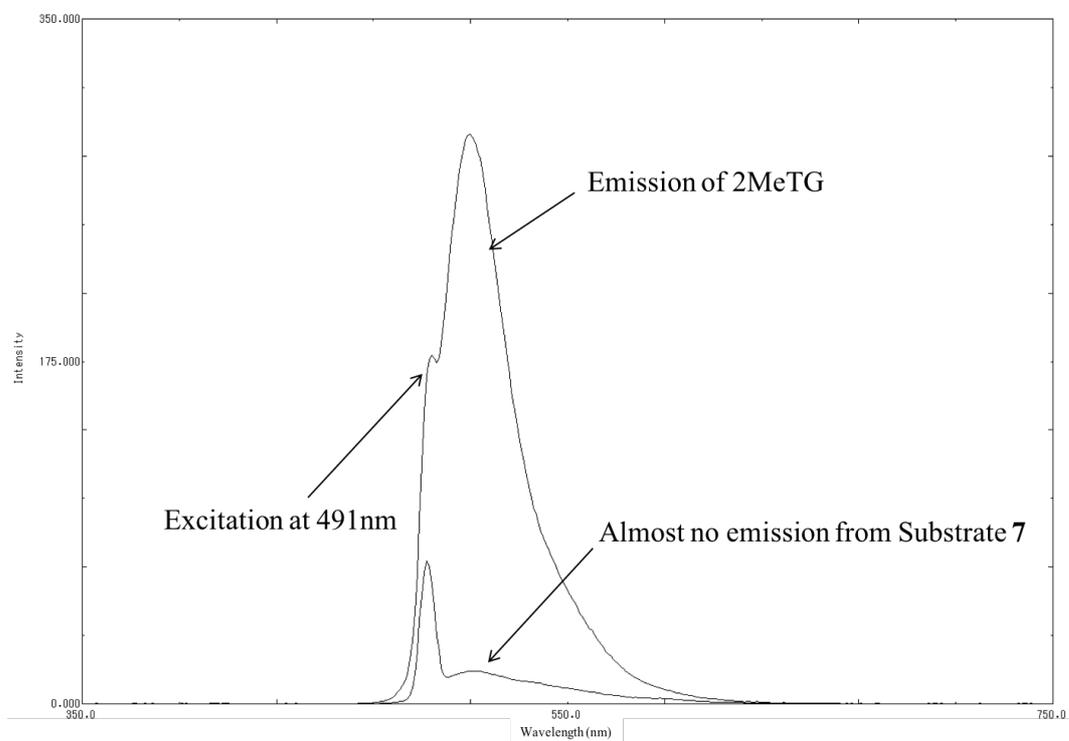


Figure 60. 蛍光基質 7 および 2MeTG の蛍光スペクトル

4-6-5. 蛍光基質 8-13 溶液および蛍光色素溶液の調整

蛍光基質 **8** (molecular weight: 591.57) 1.0 mg を DMSO 169 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **8** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **8** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 nM 蛍光基質 **8** 溶液を作製した。

蛍光基質 **9** (molecular weight: 608.52) 1.0 mg を DMSO 164 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **9** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **9** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 40 μL と PBS 3960 μL を混合し、100 nM 蛍光基質 **9** 溶液を作製した。

蛍光基質 **10** (molecular weight: 680.71) 1.0 mg を DMSO 147 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **10** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **10** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 nM 蛍光基質 **10** 溶液を作製した。

蛍光基質 **11** (molecular weight: 465.46) 1.0 mg を DMSO 215 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **11** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **11** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 nM 蛍光基質 **11** 溶液を作製した。

蛍光基質 **12** (molecular weight: 482.41) 1.0 mg を DMSO 207 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **12** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **12** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 40 μL と PBS 3960 μL を混合し、100 nM 蛍光基質 **12** 溶液を作製した。

蛍光基質 **13** (molecular weight: 554.60) 1.0 mg を DMSO 180 μL に溶解し、10 mM 蛍光基質 **13** 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 μM 蛍光基質 **13** 溶液を作製した。さらに、10 μM の溶液 4 μL と PBS 3996 μL を混合し、10 nM 蛍光基質 **13** 溶液を作製した。

Resorufin (molecular weight: 213.19) 1.0 mg を DMSO 469 μL に溶解し、10 mM

resorufin 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M resorufin 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM resorufin 溶液を作製した。

TFMU (molecular weight: 230.14) 1.0 mg を DMSO 435 μ L に溶解し、10 mM TFMU 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M TFMU 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 40 μ L と PBS 3960 μ L を混合し、100 nM TFMU 溶液を作製した。

2MeTG (molecular weight: 304.34) 1.0 mg を DMSO 329 μ L に溶解し、10 mM 2MeTG 溶液を作製した。また、10 mM 溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 μ M 2MeTG 溶液を作製した。さらに、10 μ M の溶液 4 μ L と PBS 3996 μ L を混合し、10 nM 2MeTG 溶液を作製した。

4-6-6. 蛍光基質 **8-13** 溶液および蛍光色素溶液の蛍光スペクトル測定

調製した蛍光基質 **8-13** 溶液および蛍光色素溶液について、10 nM 蛍光基質 **8, 11** および resorufin 溶液は励起波長 571 nm、100 nM 蛍光基質 **9, 12** および TFMU 溶液は励起波長 385 nm、10 pM 蛍光基質 **10, 13** および 2MeTG 溶液は励起波長 491 nm 条件下で蛍光スペクトルを測定した。

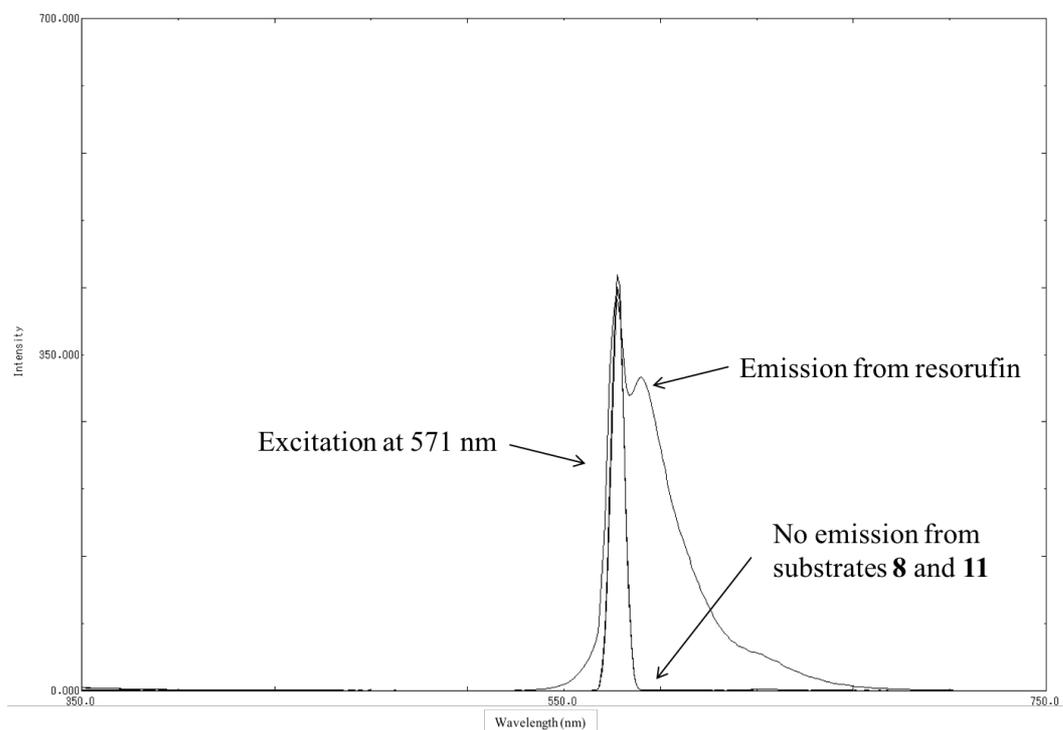


Figure 61. 蛍光基質 **8**, **11** および resorufin の蛍光スペクトル

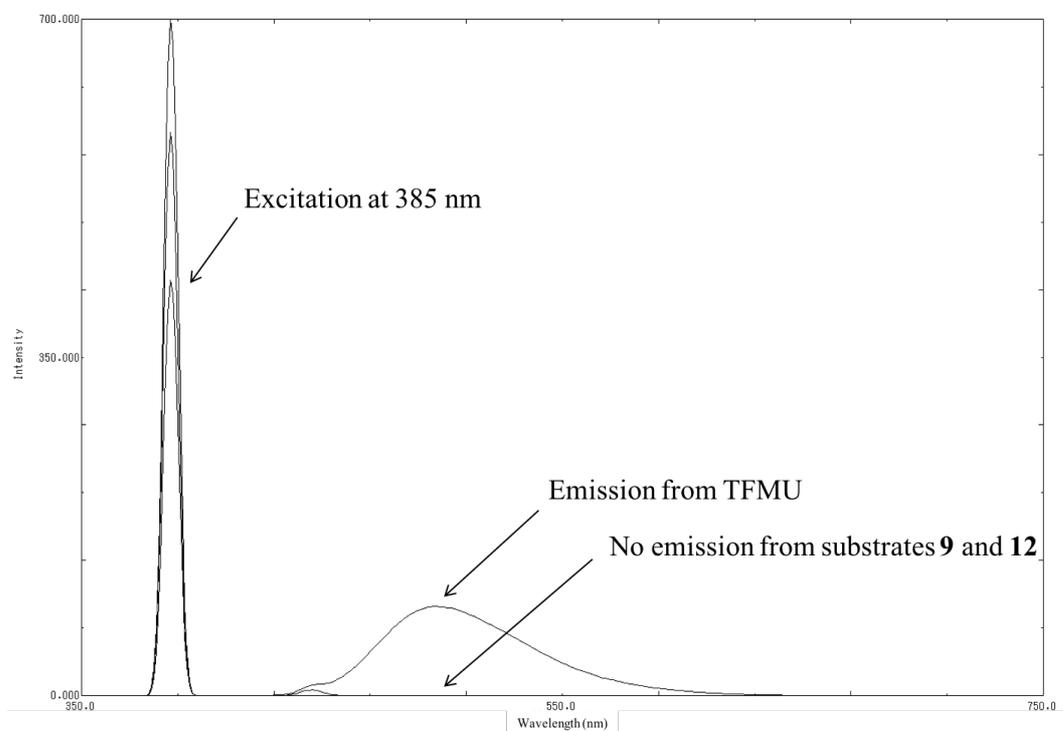


Figure 62. 蛍光基質 **9**, **12** および TFMU の蛍光スペクトル

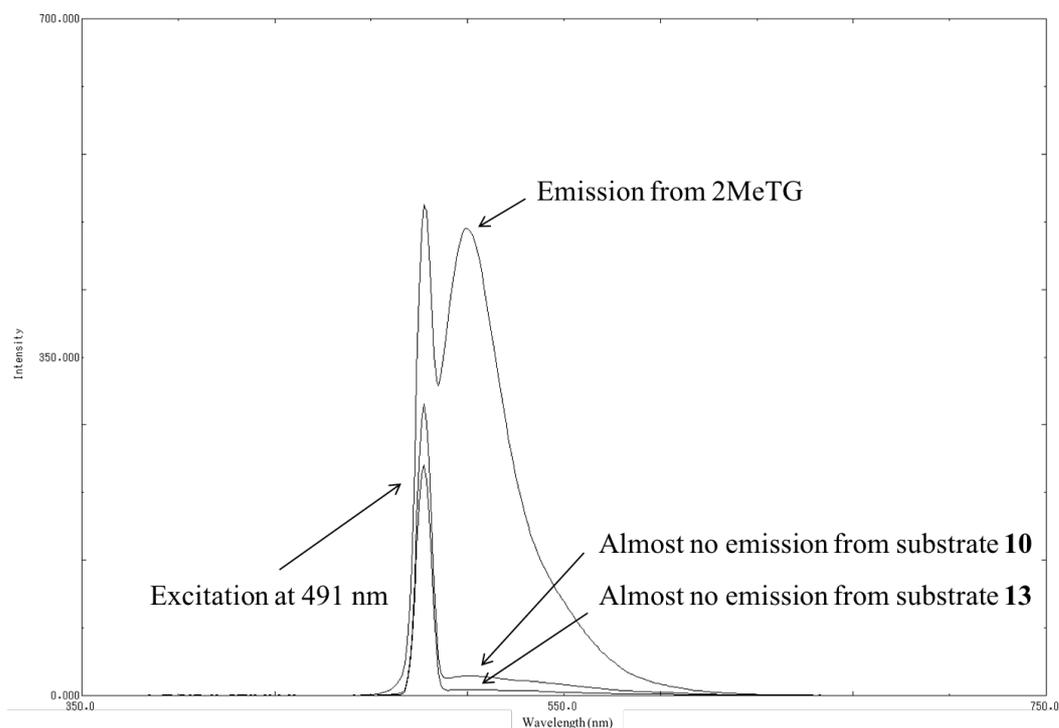


Figure 63. 蛍光基質 **10**, **13** および 2MeTG の蛍光スペクトル

4-7. CLC Drug Discovery Workbench によるドッキングモデルの構築

CLC Drug Discovery Workbench ver. 2.5 を起動したのち、Search for PDB Structures at NCBI より小胞体 α -グルコシダーゼ II (PDB ID: 5IEE) および小胞体 α -マンノシダーゼ (PDB ID: 1X9D) の立体構造をダウンロードした。続いて、Find Binding Pockets を起動し、30 Å 以上の結合ポケットを検索した。その後、Setup Docking Target を起動し、ドッキングターゲットセットアップを行なった。ドッキングに使用するタンパク質領域は、native ligand が含まれる Binding Pocket の中心から 13 Å 以内とし、Glu, Asp, His の protonation を考慮、water molecules を考慮しない設定とした。続いて、Docking Ligands を起動し、Docking Simulation settings よりドッキング回数を 100,000 回、Keep ligand conformation rigid during docking をチェック、Output Settings より Number of docking results returned for each ligand を 50、Calculate RMSDs between input structure and results および Embed the

docking target in the Docking Results Table をチェックした。得られたドッキングモデルの中から、糖残基が完全に pocket に収まっているものおよび RMSD の値が小さいものを選択し、ドッキングモデルとして採用した。

4-8. 光親和性標識法を用いた新規 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

4-8-1. 光親和性プローブ **14** を用いた標的酵素の光標識化

DMEM を 1 mL を加えた 6-well plate (TPP Techno Plastic Products AG, 92006) に、HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、 37°C 、 CO_2 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 $100 \mu\text{M}$ となるように光親和性プローブ **14** (1 mg 光親和性プローブ **14** / 35.0 μL DMSO) 溶液を 5 μL 加え、 37°C 、 CO_2 濃度 5 % の条件下で 6 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、UV transilluminator (UVP, LM-20) を用いて 365 nm の UV を 4°C で 15 分間照射した。その後、PBS を除去し、RIPA buffer (和光純薬工業, 182-02451) を 1well あたり 50 μL 加え、セルスクレイパー (TPP Techno Plastic Products AG, 99002) を用いて細胞を 1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。回収した細胞を 4°C で 10 分間静置した後、 4°C 、14,500 rpm, 20 min 遠心し、上清を細胞溶解液として 1.5 mL エッペンドルフチューブ回収した。

4-8-2. クリック反応による光標識化タンパク質へのビオチンの導入およびビオチン標識タンパク質の精製

100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 4.89 mL に細胞溶解液 300 μL 、20 mM azide-PEG3-biotin (Sigma-Aldrich, 762024, 2 mg azide-PEG3-biotin / H_2O 224.9 μL)

溶液 120 μ L、20 mM CuSO_4 (和光純薬工業, 039-04412, 25 mg CuSO_4 / H_2O 5.0 mL) 30 μ L および 50 mM THPTA (1 mg THPTA / H_2O 230 mL) 50 μ L 混合溶液、100 mM aminoguanidine hydrochloride (Sigma-Aldrich, 396494, 11 mg aminoguanidine hydrochloride / H_2O 1 mL) 300 μ L および 100 mM sodium ascorbate (和光純薬工業, 196-01252, 20 mg sodium ascorbate / H_2O 1 mL) 300 μ L を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間振盪した。続いて、反応後溶液を 1 % Tween 20 水溶液 2 L に対して 3 回透析を行ったのち、得られた溶液を 15 mL コーニングチューブに回収し、NeutrAvidin agarose resin (Thermo Fisher Scientific, 29200) 150 μ L を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩振盪した。その後、9,200 \times g で 30 秒間遠心分離し、得られた NeutrAvidin agarose を RIPA buffer 1 mL で 3 回洗浄したのち、sample buffer (0.125 M Tris-HCl (pH6.8), 10 % (v/v) 2-mercaptoethanol, 4 % (w/v) sodium dodecyl sulfate, 10 % (w/v) sucrose, 0.01 % (w/v) bromophenol blue) 50 μ L を加え、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間処理し、NeutrAvidin agarose を micro bio-spin chromatography columns (BIO-RAD, 732-6204) により除去した。得られた上清を精製タンパク質サンプルとして新たな 1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。続いて、得られたサンプル 25 μ L について、5%-20% poly acrylamide gel (ATTO, E-T520L) を用いてラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO, AE-6500) で 250 V, 20 mA で 60 分間電気泳動を行ったのち、EzStain Silver kit (ATTO, AE-1360) でタンパク質を染色し、全タンパク質を含む領域をすべて切り出した。

4-8-3. ウェスタンブロットングによるビオチン標識タンパク質および GLB1 の検出

4-8-3-1. PVDF 膜転写のための溶液の調製

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 18.2 g (終濃度: 300 mM) に MeOH 25 mL を加え、イオン交換水で 500 mL に fill up した。これを A 溶液とした。

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 1.5 g (終濃度: 25 mM) に MeOH 25 mL を加え、イオン交換水で 500 mL に fill up した。これを B 溶液とした。

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 1.5 g (終濃度: 25 mM) および 6-aminohexanoic acid 2.6 g (東京化成工業, A0312, 終濃度 40 mM) に MeOH 25 mL を加え、イオン交換水で 500 mL に fill up した。これを C 溶液とした。

EzTBS (ATTO, WSE-7230) 100 mL に Tween-20 1 g (終濃度: 1%) を加え、イオン交換水で 1,000 mL に fill up した。これを wash buffer とした。

4-8-3-2. Avidin-HRP 抗体を用いたビオチン標識タンパク質の検出

得られた精製タンパク質サンプル 25 μ L について、5%–20% poly acrylamide gel (ATTO, E-T520L) を用いてラピダス・ミニスラブ電気泳動槽で 250 V, 20 mA, 65 分間電気泳動した。続いて、ブロッティング装置 (ATTO, WSE-4040 HorizeBLOT 4 M-R) の陽極プレート上に A 溶液に浸したろ紙 (ATTO, CB-09A) 2 枚、B 溶液に浸したろ紙 1 枚、MeOH に浸し親水化したのち B 溶液に浸した PVDF 膜 (ATTO, AE-6665) 1 枚、B 溶液に浸した電気泳動後ゲル 1 枚、C 溶液に浸したろ紙 3 枚の順に重ね、40 V, 144 mA, 30 min 膜転写した。転写後 PVDF 膜を Ez Block chemi (ATTO, AE-1475) 75 mL に加え 1 時間振盪した。その後、Ez Block chemi を除去し、wash buffer で軽く 3 回洗浄したのち、wash buffer 100 mL で 3 回洗浄 (10 分間, 5 分間, 5 分間) した。次に HRP-Streptavidin conjugate 溶液 (HRP-Streptavidin conjugate (invitrogen, 434323) : wash buffer = 1 : 5,000) を加え、1 時間振盪した。振盪後、溶液を除去、wash buffer で軽く 3 回洗浄し、wash buffer 100 mL で 3 回洗浄 (10 分間, 5 分間, 5 分間) した。その後、洗浄した PVDF 膜をイムノスター LD (和光純薬工業, 296-69901) に 1 min 浸し、発光を ChemiDoc MP システム (BIO-RAD) で観察した。

4-8-3-3. GLB1 に対する抗体を用いた GLB1 由来タンパク質の検出

得られた精製タンパク質サンプル 25 μ L について、5%–20% poly acrylamide gel を用いてラピダス・ミニスラブ電気泳動槽で 250 V, 20 mA, 65 分間電気泳動した。続いて、ブロットイング装置の陽極プレート上に A 溶液に浸したろ紙 2 枚、B 溶液に浸したろ紙 1 枚、親水化し B 溶液に浸した PVDF 膜 1 枚、B 溶液に浸した電気泳動後ゲル 1 枚、C 溶液に浸したろ紙 3 枚の順に重ね、40 V, 144 mA, 30 min 膜転写した。転写後 PVDF 膜を Ez Block chemi 75 mL に加え 1 時間振盪した。その後、Ez Block chemi を除去し、wash buffer で軽く 3 回洗浄したのち、wash buffer 100 mL で 3 回洗浄 (10 分間, 5 分間, 5 分間) した。次に 1 次抗体溶液 (anti-GLB1 antibody (abcam, ab203749): wash buffer = 1 : 300) を加え、1 時間振盪した。振盪後、溶液を除去、wash buffer で軽く 3 回洗浄し、wash buffer 100 mL で 3 回洗浄 (10 分間, 5 分間, 5 分間) したのち、2 次抗体溶液 (anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology, #7074): wash buffer = 1 : 2,000) を加え、1 時間振盪した。振盪後、溶液を除去、wash buffer で軽く 3 回洗浄し、wash buffer 100 mL で 3 回洗浄 (10 分間, 5 分間, 5 分間) した。その後、洗浄した PVDF 膜をイムノスターLD に 1 分間浸し、発光を ChemiDoc MP システムで観察した。

4-8-4. 精製タンパク質の LC-MS/MS 解析

4-8-4-1. LC-MS/MS 解析のための溶液の調製

30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (Sigma-Aldrich, 702587) 3 mL に 100 mM $Na_2S_2O_3$ (和光純薬工業, 196-15162) を 3 mL 加えた。これを destaining solution (終濃度: 15 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 50 mM $Na_2S_2O_3$) とした。

超純水 5.79 mL に (\pm)-dithiothreitol (和光純薬工業, 044-29221) 60 μ L および 1 M NH_4HCO_3 (和光純薬工業, 018-21742) 150 μ L を加えた。これを reducing solution

(終濃度: 1% (±)-dithiothreitol, 25 mM NH₄HCO₃) とした。

超純水 16 mL に 1 M NH₄HCO₃ 400 μL を加えた。これを wash buffer (終濃度: 25 mM NH₄HCO₃) とした。

Acetonitrile 12 mL に 1 M NH₄HCO₃ 600 μL および超純水 11.4 mL を加えた。これを dehydration solution (終濃度: 50% acetonitrile, 25 mM NH₄HCO₃) とした。

Iodoacetamide 50 mg に wash buffer 5 mL を加えた。これを alkylation solution (終濃度: 1% iodoacetamide in washing buffer) とした。

50 mM NH₄HCO₃ 180 μL に 100 μg/mL trypsin (promega, V5113, trypsin 20 μg / trypsin resuspension buffer 200 μL) 20 μL を加えた。これを trypsin solution (終濃度: 10 μg/mL trypsin, 45 mM NH₄HCO₃) とした。

Acetonitrile 500 μL に 10% trifluoro acid (和光純薬工業, 201-06393, trifluoro acid 100 μL / 超純水 900 μL) 500 μL を加えた。これを extract solution (終濃度: 50% acetonitrile, 5% trifluoroacetic acid) とした。

4-8-4-2. LC-MS/MS 解析のための精製タンパク質の調製

得られた全タンパク質を含むゲルサンプルについて、destaining solution を用いて脱銀染色したのち、アセトニトリルを加え、減圧下で溶媒を留去した。続いて、reducing solution を用いてゲルサンプルに含まれるタンパク質のジスルフィド結合を切断し、alkylation solution を用いて SH 基をアルキル基で保護したのち、wash buffer により洗浄、dehydration solution を加え、減圧下で溶媒を留去した。その後、trypsin solution を 30 μL 加え、37 °C で 18 時間タンパク質をゲル内消化した。ゲル内消化により得られたペプチドは、extract solution を用いて抽出したのち、減圧下で溶媒を留去し、得られた残渣を 13 μL の 0.1% formic acid に溶解した。

4-8-5. タンパク質の LC-MS/MS 解析およびデータ処理

ペプチドは capillary HPLC system (Advance nanoflow UHPLC system: Bruker) とオンラインで接続され、nano-LC with ESI source (Captive spray: Bruker) と連結された Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて分析した。

また、ペプチドサンプルは autosampler (HTC-PAL system, CTC Analytics AG) を用いて analytical column に導入した。

ゲルから抽出したペプチドサンプル 10 μ L をまず C8 cartridge (trapcolumn, L-column 2C8, 0.3 \times 5 mm, CERI) に導入し、続いて溶出したペプチドを analytical column (L-column Micro C18, 3 μ m, 0.2 mm \times 50 mm, CERI) に導入した。

ペプチドは、buffer A (2% acetonitrile, 0.1% formic acid) から buffer B (90% acetonitrile, 0.1% formic acid) への濃度勾配を用いて溶出させた。分析初期に buffer A (2% acetonitrile, 0.1% formic acid) を用いて洗浄後、ペプチドを 5%-80% buffer B の直線勾配を用いて 30 分かけて溶出させ、HPLC カラム溶出液は、Q Exactive 質量分析計の ESI 源に直接流入した。

Xcalibur software ver. 2.9 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、top 10 の最も強いイオンの Automated peak recognition, dynamic exclusion, daughter ion scanning を実施し、スペクトルは、450-2000 質量単位の範囲でスキャンした。

ペプチド分析は、Proteome Discoverer software version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) 内の percolator を用いてデータ解析プログラムである SEQUEST HT を使用した。二重荷電したペプチドの予備的陽性確認の基準は、相関係数 (Xcorr) が 2.5 より大きく、デルタ相互相関係数 (deltaCn) が 0.1 より大きい、高い予備スコアおよび最小限のトリプシンペプチド末端を有する。三重荷電したペプチドについては、相関因子の閾値は 3.5 に設定した。すべてのペプチドの false discovery rate はそれぞれ 0.01% および 0.05% である。検出された全てのスペクトルを、UniProtKB の Homo sapiens 由来 GLB1 に対して検索した。

4-9. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の探索

蛍光強度は、下記フィルターセットが備えられたマルチプレートリーダー (BioTek, Synergy2) により記録した。filter sets for excitation, 485/20 nm; emission, 528/20 nm for 2-MeTG

4-9-1. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からの阻害剤探索のための蛍光基質溶液および阻害剤候補化合物の調製

蛍光基質 **6** 1.0 mg を DMSO 225.6 μ L に溶解し、6 mM 蛍光基質 **6** 溶液を作製した。また、6 mM 溶液 3 μ L と DMSO 3 μ L を混合し、3 mM 蛍光基質 **6** 溶液 (negative control として使用) を作製した。

NPDepo ライブラリ化合物についてすべての化合物濃度を 2.0 mg/mL とするため、化合物濃度 10 mg/mL の場合は、10 mg/mL 化合物溶液を 1 μ L 分取し、DMSO 4 μ L 加えた。化合物濃度 3.3 mg/mL の場合は、3.3 mg/mL 化合物溶液を 2 μ L 分取し、DMSO 1.3 μ L 加えた。化合物濃度 2.0 mg/mL の場合は、2.0 mg/mL 化合物溶液をそのまま用いた。

また、化合物濃度 1.0 mg/mL とするため、作製した 2.0 mg/mL 化合物溶液をそれぞれ 3 μ L 分取し、DMSO 3 μ L を加えた。

さらに、化合物濃度 0.5 mg/mL とするため、作製した 1.0 mg/mL 化合物溶液をそれぞれ 3 μ L 分取し、DMSO 3 μ L を加えた。

終濃度 1 μ g/well NPDepo ライブラリ化合物および 11.5 μ M 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、2.0 mg/mL の NPDepo ライブラリ化合物をそれぞれ 2 μ L 分取し、6 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 2 μ L 加えた。これら NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を一次スクリーニングおよび二次スクリーニングで用いた。

終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ NPDepo ライブラリ化合物および 11.5 μM 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、1.0 mg/mL の NPDepo ライブラリ化合物をそれぞれ 2 μL 分取し、6 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 2 μL 加えた。これら NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を二次スクリーニングで用いた。

終濃度 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ NPDepo ライブラリ化合物および 11.5 μM 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、0.5 mg/mL の NPDepo ライブラリ化合物をそれぞれ 2 μL 分取し、6 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 2 μL 加えた。これら NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を二次スクリーニングで用いた。

4-9-2. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の一次スクリーニング

72-96 時間培養した HeLa 細胞を含む 25 cm^2 または 75 cm^2 細胞培養用ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG, 90076) から DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄後、trypsin 溶液を加え、ディッシュから細胞を剥がしたのち、細胞懸濁液を 15 mL コーニングチューブに移し、3,000 rpm, 室温で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を除去し、DMEM 1 mL を加え細胞懸濁液としたのち、細胞数を測定した。HeLa 細胞が 1.0×10^5 cells/well となるように、細胞懸濁液および DMEM をリザーバーに分取し、96-well plate (FALCON, 353376) に 250 $\mu\text{L}/\text{well}$ の細胞懸濁液をそれぞれ加え、37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。続いて、96-well plate から DMEM を除去し、抗生物質不含 DMEM を 259 $\mu\text{L}/\text{well}$ および濃度調製した NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ (終濃度: NPDepo ライブラリ化合物 1 $\mu\text{g}/\text{well}$, 蛍光基質 **6** 11.5 μM) 加え、インキュベーションシェーカー (TOMY, IS-963) で 800 rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間振盪したのち、37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。その後、96-well plate から DMEM を除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、PBS 250 $\mu\text{L}/\text{well}$ を加え、マルチプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

4-9-3. 天然化合物ライブラリ (NPDepo ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の二次スクリーニング

72-96 時間培養した HeLa 細胞を含む 25 cm² または 75 cm² 細胞培養用ディッシュから DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄後、trypsin 溶液を加え、ディッシュから細胞を剥がしたのち、細胞懸濁液を 15 mL コーニングチューブに移し、3,000 rpm, 室温で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を除去し、DMEM 1 mL を加え細胞懸濁液としたのち、細胞数を測定した。HeLa 細胞が 1.0×10^5 cells/well となるように、細胞懸濁液および DMEM をリザーバーに分取し、96-well plate に 250 μ L/well の細胞懸濁液をそれぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。続いて、96-well plate から DMEM を除去し、抗生物質不含 DMEM を 259 μ L/well および濃度調製した NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を 1 μ L/well (終濃度: NPDepo ライブラリ化合物 1 μ g/well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M、NPDepo ライブラリ化合物 0.5 μ g/well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M または NPDepo ライブラリ化合物 0.25 μ g/well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M) それぞれ加え、インキュベーションシェーカーで 800 rpm, 37 °C で 5 分間振盪したのち、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、96-well plate から DMEM を除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、PBS 250 μ L/well を加え、マルチプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

4-9-4. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からの阻害剤探索のための蛍光基質溶液および阻害剤候補化合物の調製

蛍光基質 **6** 1.0 mg を DMSO 338.4 μ L に溶解し、4 mM 蛍光基質 **6** 溶液を作製した。また、4 mM 溶液 12 μ L と DMSO 4 μ L を混合し、3 mM 蛍光基質 **6** 溶液

(negative control として使用) を作製した。

生薬由来ライブラリ化合物について、10 mM 化合物溶液をそのまま用いた。

また、化合物濃度 1 mM とするため、作製した 10 mM 化合物溶液をそれぞれ 1 μ L 分取し、DMSO 9 μ L を加えた。

さらに、化合物濃度 0.1 mM とするため、作製した 1 mM 化合物溶液をそれぞれ 1 μ L 分取し、DMSO 9 μ L を加えた。

終濃度 10 μ M/well 生薬由来ライブラリ化合物および 11.5 μ M 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、10 mM の生薬由来ライブラリ化合物をそれぞれ 1 μ L 分取し、4 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 3 μ L 加えた。これら生薬由来ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を一次スクリーニングおよび二次スクリーニングで用いた。

終濃度 1 μ M/well 生薬由来ライブラリ化合物および 11.5 μ M 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、1 mM の生薬由来ライブラリ化合物をそれぞれ 1 μ L 分取し、4 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 3 μ L 加えた。これら生薬由来ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を二次スクリーニングで用いた。

終濃度 0.1 μ M/well 生薬由来ライブラリ化合物および 11.5 μ M 蛍光基質 **6** 混合溶液を作製するため、0.1 mM の生薬由来ライブラリ化合物をそれぞれ 1 μ L 分取し、4 mM 蛍光基質 **6** 溶液を 3 μ L 加えた。これら生薬由来ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を二次スクリーニングで用いた。

4-9-5. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の一次スクリーニング

72-96 時間培養した HeLa 細胞を含む 25 cm^2 または 75 cm^2 細胞培養用ディッシュから DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄後、trypsin 溶液を加え、ディッシュから細胞を剥がしたのち、細胞懸濁液を 15 mL コーニングチューブに移し、3,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を除去し、DMEM 1 mL を

加え細胞懸濁液としたのち、細胞数を測定した。HeLa 細胞が 1.0×10^5 cells/well となるように、細胞懸濁液および DMEM をリザーバーに分取し、96-well plate に 250 μ L/well の細胞懸濁液をそれぞれ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。続いて、96-well plate から DMEM を除去し、抗生物質不含 DMEM を 259 μ L/well および濃度調整した生薬由来ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を 1 μ L/well (終濃度: 生薬由来ライブラリ化合物 10 μ M/well, 蛍光基質 **6** 11.5 μ M) 加え、インキュベーションシェーカーで 800 rpm, 37 $^{\circ}$ C で 5 分間振盪したのち、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、96-well plate から DMEM を除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、PBS 250 μ L/well を加え、マルチプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

4-9-6. 天然化合物ライブラリ (生薬由来ライブラリ) からのゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ特異的阻害剤の二次スクリーニング

72-96 時間培養した HeLa 細胞を含む 25 cm² または 75 cm² 細胞培養用ディッシュから DMEM を除去し、PBS で 3 回洗浄後、trypsin 溶液を加え、ディッシュから細胞を剥がしたのち、細胞懸濁液を 15 mL コーニングチューブに移し、3,000 rpm, 室温で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を除去し、DMEM 1mL を加え細胞懸濁液としたのち、細胞数を測定した。HeLa 細胞が 1.0×10^5 cells/well となるように、細胞懸濁液および DMEM をリザーバーに分取し、96-well plate に 250 μ L/well の細胞懸濁液をそれぞれ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。続いて、96-well plate から DMEM を除去し、抗生物質不含 DMEM を 259 μ L/well および濃度調整した NPDepo ライブラリ化合物および蛍光基質 **6** 混合溶液を 1 μ L/well (終濃度: 生薬由来ライブラリ化合物 10 μ M /well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M、生薬由来ライブラリ化合物 1 μ M /well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M または生薬由来ライブラリ化合物 0.1 μ M/well および蛍光基質 **6** 11.5 μ M) それぞれ加え、インキュベーションシェーカーで 800 rpm, 37 $^{\circ}$ C で 5 分間振盪し

たのち、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、96-well plate から DMEM を除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、PBS 250 μL/well を加え、マルチプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

参考文献

1. 石浦章一, 石川統, 須藤和夫, 野田春彦, 丸山工作, 山本啓一訳 分子細胞生物学第5版, 東京化学同人, p. 59–63
2. Witze, E. S.; Old, W. M.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 798–806.
3. Deribe, Y. L.; Pawson, T.; Dikic, I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 666–672.
4. Siman, P.; Brik, A. Chemical and semisynthesis of posttranslationally modified proteins. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5684–5697.
5. Doyle, H. A., Mamula, M. J. Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 443–449.
6. Mann, M., Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 255–261.
7. Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 448–462.
8. Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., Molinari, M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 72–82
9. Molinari, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 313–20.
10. Needham, P. G.; Brodsky, J. L. How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: the early history of ERAD. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1833*, 2447–2457.
11. 谷口直之, 伊藤幸成 糖鎖科学の新展開 - 機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて -, エヌ・ティー・エス, p. 4–17
12. Karacali, S.; Izzetoglu, S.; Deveci, R. Glycosylation changes leading to the increase in size on the common core of N-glycans, required enzymes, and related cancer-associated proteins. *Turk. J. Biol.* **2014**, *38*, 754–771.

13. Freeze, H. H. Genetic defects in the human glycome. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 537–551.
14. Brockhausen, I. Mucin-type *O*-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 599–604.
15. Vasconcelos-Dos-Santos, A.; Oliveira, I. A.; Lucena, M. C.; Mantuano, N. R.; Whelan, S. A.; Dias, W. B.; Todeschini, A. R. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 138. doi: 10.3389/fonc.2015.00138.
16. Buettner, F. F.; Ashikov, A.; Tiemann, B.; Lehle, L.; Bakker, H. C. *C. elegans* DPY-19 is a *C*-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell* **2013**, *50*, 295–302. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.003.
17. Niwa, Y.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Simizu, S. Identification of DPY19L3 as the *C*-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell.* **2016**, *27*, 744–756. doi: 10.1091/mbc. E15-06-0373.
18. Chiba, Y., Akeboshi, H. Glycan engineering and production of 'humanized' glycoprotein in yeast cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 786-795.
19. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A. C., Gomord, V., Faye, L. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **1998**, *38*, 31-48.
20. Saint-Jore-Dupas, C., Nebenführ, A., Boulaflous, A., Follet-Gueye, M. L., Plasson, C., Hawes, C., Driouich, A., Faye, L., Gomord, V. Plant *N*-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell.* **2006**, *18*, 3182-3200.
21. Tomiya, N., Narang, S., Lee, Y. C., Betenbaugh, M. J. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 343-360.
22. Abdul-Rahman, B., Ailor, E., Jarvis, D., Betenbaugh, M., Lee, Y. C. β -(1→4)-Galactosyltransferase activity in native and engineered insect cells measured with

- time-resolved europium fluorescence. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2181-2186.
23. Geisler, C., Jarvis, D. L. Substrate specificities and intracellular distributions of three N-glycan processing enzymes functioning at a key branch point in the insect N-glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7084-7097.
 24. Watanabe, S.; Kokuho, T.; Takahashi, H.; Takahashi, M.; Kubota, T.; Inumaru, S. Sialylation of N-glycans on the recombinant proteins expressed by a baculovirus-insect cell system under β -N-acetylglucosaminidase inhibition. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5090–5093.
 25. Nomura, T.; Ikeda, M.; Ishiyama, S.; Mita, K.; Tamura, T.; Okada, T.; Fujiyama, K.; Usami, A. Cloning and characterization of a β -N-acetylglucosaminidase (BmFDL) from silkworm *Bombyx mori*. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 386–391. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.04.008.
 26. Kokuho, T.; Yasukochi, Y.; Watanabe, S.; Inumaru, S. Molecular cloning and expression profile analysis of anovel β -D-N-acetylhexosaminidase of domestic silkworm (*Bombyx mori*). *Genes Cells* **2010**, *15*, 525–535.
 27. Caputo, A. T., Alonzi, D. S., Marti, L., Reca, I. B., Kiappes, J. L., Struwe, W. B., Cross, A., Basu, S., Lowe, E. D., Darlot, B., Santino, A., Roversi, P., Zitzmann, N. Structures of mammalian ER α -glucosidase II capture the binding modes of broad-spectrum iminosugar antivirals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2016**, *113*, E4630–E4638. doi: 10.1073/pnas.1604463113.
 28. Karaveg, K., Siriwardena, A., Tempel, W., Liu, Z. J., Glushka, J., Wang, B. C., Moremen, K. W. Mechanism of class 1 (glycosylhydrolase family 47) α -mannosidases involved in N-glycan processing and endoplasmic reticulum quality control. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16197-16207.
 29. Hakamata, W.; Machida, A.; Oku, T.; Nishio, T. Design and synthesis of an ER-specific fluorescent probe based on carboxylesterase activity with quinone methide cleavage process. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3206–3209.
 30. Hakamata, W.; Tamura, S.; Hirano, T.; Nishio, T. Multicolor imaging of endoplasmic

- reticulum-located esterase as a prodrug activation enzyme. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 321–325.
31. Carboxy-H2DFFDA, C-13293, H2DCFDA, D-399, Oregon green carboxylic acid diacetate, O6151 (Molecular Probes)
 32. FluoForte Calcium Assay Kit, ENZ-51017, eFluXX-ID Green Multidrug Resistance Assay Kit, ENZ-51029 (ENZO Life Sciences)
 33. Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
 34. Horton, D. 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl chloride. *Org. Synth.* **1966**, *46*, 1–4.
 35. Roy, R.; Tropper, F. D. Carbohydrate protein interactions. Syntheses of agglutination inhibitors of wheat germ agglutinin by phase transfer catalysis. *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 817–821.
 36. Hou, Y.; Tse, R.; Mahuran, D. J. Direct determination of the substrate specificity of the α -active site in heterodimeric β -hexosaminidase A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3963–3969.
 37. Lemieux, M. J.; Mark, B. L.; Cherney, M. M.; Withers, S. G.; Mahuran, D. J.; James M. N. G. Crystallographic structure of human β -hexosaminidase A: interpretation of tay-sachs mutations and loss of G_{M2} ganglioside hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 913–929.
 38. Michihara, A., Toda, K., Kubo, T., Fujiwara, Y., Akasaki, K., Tsuji, H. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 947-51.
 39. Alpers, D. H. Separation and isolation of rat and human intestinal β -galactosidases. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1238–1246.
 40. Asp, N. G.; Dahlqvist, A. Human small intestine galactosidases. Specific assay of three different enzymes. *Anal. Biochem.* **1972**, *47*, 527–538.

41. Ohto, U.; Usui, K.; Ochi, T.; Yuki, K.; Satow, Y.; Shimizu, T. Crystal structure of human β -galactosidase: structural basis of G_{m1} gangliosidosis and morquio B diseases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1801–1812.
42. Klausner, R. D.; Donaldson, J. G.; Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell. Biol.* **1992**, *116*, 1071-1080.
43. Helms, J. B.; Rothman, J. E. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **1992**, *360*, 352-354.
44. Michalski, J. C.; Klein, A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: α - and β -mannosidosis, fucosidosis and α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1455*, 69–84.
45. Scanlin, T. F.; Glick, M. C. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1455*, 241–253.
46. Callahan, J. W. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure–function studies of lysosomal β -galactosidase and the non-lysosomal β -galactosidase-like protein. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* **1999**, *1455*, 85–103.
47. Caciotti, A.; Donati, M. A.; Boneh, A.; d'Azzo, A.; Federico, A.; Parini, R.; Antuzzi, D.; Bardelli, T.; Nosi, D.; Kimonis, V.; Zammarchi, E.; Morrone, A. Role of β -galactosidase and elastin binding protein in lysosomal and nonlysosomal complexes of patients with GM1-gangliosidosis. *Hum. Mutat.* **2005**, *25*, 285–292.
48. Privitera, S.; Prody, C. A.; Callahan, J. W.; Hinek, A. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of β -galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6319–6326.
49. Zhang, S.; McCarter, J. D.; Okamura-Oho, Y.; Yaghi, F.; Hinek, A.; Withers, S. G.; Callahan, J. W. Kinetic mechanism and characterization of human β -galactosidase precursor secreted by permanently transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem.*

- J.* **1994**, *304*, 281–288.
50. Morreau, H.; Galjart, N. J.; Gillemssen, N.; Willemsen, R.; van der Horst, G. T.; d'Azzo, A. Alternative splicing of β -galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a β -galactosidase-related protein. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20655–20663.
 51. Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J. D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1798–1806.
 52. Kamiya, M., Kobayashi, H., Hama, Y., Koyama, Y., Bernardo, M., Nagano, T., Choyke, P. L., Urano, Y. An enzymatically activated fluorescence probe for targeted tumor imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3918–3929.
 53. Scherpenzeel, M. V., Moret, E. E., Ballell, L., Liskamp, R. M., Nilsson, U. J., Leffler, H., Pieters, R. J. Synthesis and evaluation of new thiodigalactoside-based chemical probes to label galectin-3. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1724–1733.

謝辞

本研究の遂行と論文の作成は、本論文の主査をお願い致しました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 西尾 俊幸 教授ならびに本論文の副査をお願い致しました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 袴田 航 准教授の終始熱心なご指導とご鞭撻の下に行われたものであり、深甚なる謝意を表します。また、本研究を進めるにあたり、多くの有益なご助言を賜りました同研究室 平野 貴子 助教に心より御礼申し上げます。

本論文の副査ならびに校閲をお願い致し、ご指導とご鞭撻を賜りました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 山形 一雄 教授ならびに松藤 寛 教授に心から感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり有益なご助言を賜りました日本大学生物資源科学部 生命化学科 荻原 淳 教授ならびに日本大学 生物資源科学部 獣医学科 成田 貴則 専任講師に深謝致します。

本研究は、公益財団法人 日本科学協会 平成 27 年度笹川科学研究助成（研究題目：精密分子プローブを用いた新規タンパク質翻訳後修飾酵素の探索と同定）ならびに公益財団法人 ホクト生物科学振興財団 平成 28 年度ホクト生物科学振興財団研究奨励金（研究題目：精密分子プローブを用いた糖鎖修飾関連酵素の蛍光イメージング）の助成をいただき研究を行わせていただきました。これら財団の方々には謹んで御礼申し上げます。

多くのご指導を賜りました日本大学生物資源科学部 生命化学科および日本大学大学院 生物資源科学研究科の先生方に厚く御礼申し上げます。

また、6年の長きにわたり生物分子機能化学研究室（現生物化学研究室）に在籍させて頂き、多くの皆様のご助力のもと研究を進めて参りました。心から御礼申し上げます。