(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6953400号
(P6953400)

(45)発行日　令和3年10月27日(2021.10.27)　(24)登録日　令和3年10月1日(2021.10.1)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	ZNA
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z
C12N 9/04	(2006.01)	C12N	9/04	Z
C12N 9/50	(2006.01)	C12N	9/50	

請求項の数 20　(全 242 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-516113(P2018-516113)
(86)(22)出願日　平成28年10月21日(2016.10.21)
(65)公表番号　特表2019-501363(P2019-501363A)
(43)公表日　平成31年1月17日(2019.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/058308
(87)国際公開番号　WO2017/070611
(87)国際公開日　平成29年4月27日(2017.4.27)
審査請求日　令和1年10月21日(2019.10.21)
(31)優先権主張番号　62/244,881
(32)優先日　平成27年10月22日(2015.10.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/345,710
(32)優先日　平成28年6月3日(2016.6.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

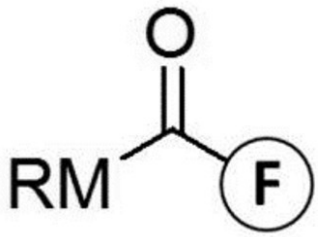
(73)特許権者　501244222
ザ　スクリプス　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０３７，　ラ　ホヤ，　ノース　トーリー　パインズ　ロード　１０５５０
(74)代理人　100082072
弁理士　清原　義博
(72)発明者　クラバット，ベンジャミン　エフ.
アメリカ合衆国　９２０３７　カリフォルニア州　ラ・ホーヤ　カミノ・デ・ラ・コスタ　４１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】システイン反応性プローブとその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する方法であって、
前記方法は、
（ａ）小分子断片とシステイン反応性プローブで処理された第１の細胞溶液を含むサンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを得る工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含み、
小分子断片は、式（Ｉ）の構造を有し、

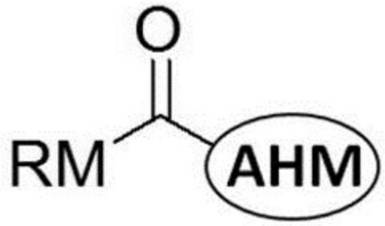
【化１】



式（Ｉ）

式中、
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、
Ｆは小分子断片部分であり、
システイン反応性プローブは、式（ＩＩ）の構造を有し、

【化２】



式（ＩＩ）

式中、
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、
ＡＨＭは親和性ハンドル部分である、工程と、
（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、
（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する工程を含む、方法。

【請求項２】
小分子断片あるいはシステイン反応性プローブは図３において例示される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】
システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定するために、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々の値を決定する工程をさらに含み、ここで、前記値は工程（ｂ）のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される、請求項１に記載の方法。

【請求項４】
前記サンプルは第２の細胞溶液をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程と、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項６】

システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群と第２の群は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを含む、請求項５に記載の方法。

【請求項７】

システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

システイン含有タンパク質は、表１、表２、表３、表８、表９、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である、請求項１に記載の方法。

【請求項９】

マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１０】

親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

親和性ハンドルは、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する、請求項１０に記載の方法。

【請求項１３】

親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１５】

工程ｃ）における同定する工程は、

（ｉ）システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群からのシステイン含有タンパク質に割り当てられた第１の値と、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群からの同じシステイン含有タンパク質の第２の値を位置付けることと、

（ｉｉ）同じシステイン含有タンパク質に割り当てられた２つの値の間の比率を計算すること、をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１６】

２を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

工程ｃ）における同定する工程は、システイン含有タンパク質へのシステイン反応性プローブの阻害の割合を計算することをさらに含む、請求項１５に記載の方法。

【請求項１８】

５０％、６０％、７０％、８０％、９０％を超える、あるいは１００％の阻害の割合は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す、請求項１７に記載の方法。

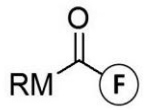
【請求項１９】
前記方法はインサイツ法である、請求項１－１８のいずれか１つに記載の方法。
【請求項２０】
システイン反応性プローブは、４－ヒドロキシノネナールでも、１５－デオキシ－Δ１２，１４－プロスタグランジンＪ２でもない、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
＜相互参照＞
本出願は、２０１６年６月３日に出願された米国仮出願第６２／３４５，７１０号と２０１５年１０月２２日に出願された米国仮出願第６２／２４４，８８１号の利益を主張するものであり、文献の各々は参照により全体として本明細書に組み込まれる。
【０００２】
連邦政府が支援する研究に関する陳述
本明細書で開示される発明は、国立衛生研究所によって、認可番号ＣＡ０８７６６０、ＧＭ０９０２９４、ＧＭ１０８２０８、およびＧＭ０６９８３２で、少なくとも部分的には米国政府の支援を受けて作られた。したがって、米国政府は本発明に一定の権利を有している。
【０００３】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、参照によって本明細書に組み込まれる配列表を含んでいる。２０１６年１０月１９日に作成された上記のＡＳＣＩＩコピーは、４８０５４－７０２＿６０１＿ＳＬ．ｔｘｔと命名され、３７２，８３８バイトのサイズである。
【背景技術】
【０００４】
タンパク質機能の割り当ては、天然の生体系におけるタンパク質の発現を選択的に妨害する、標的遺伝子破壊、ＲＮＡ干渉、およびゲノム編集技術などの遺伝学的手法から利益を得てきた。化学プローブは、細胞と生命体において急性的かつ可逆的に導入される、段階的な（用量依存的な）利益（アゴニズム）または損失（アンタゴニズム）獲得を生み出すという利点を有するタンパク質を変動させる相補的な方法を提示する。小分子はタンパク質を選択的に調節し、かつ新規な治療の開発のための先例としての役割を果たす代替的な方法を提示する。
【発明の概要】
【０００５】
ある実施形態において、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する方法が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）システイン反応性プローブで処理されたサンプルからシステイン反応性プローブタンパク質複合体のセットを得る工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定するために、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々に、値を割り当てる工程をさらに含み、ここで値は工程（ｂ）のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、サンプルは第１の細胞溶液と第２の細胞溶液を含む。いくつかの実施形態において、方法はシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程をさ

らに含む。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、方法は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、第１のシステイン反応性プローブと第２のシステイン反応性プローブは同じである。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群と第２の群は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを含む。いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液からの細胞は培地（例えば同位体富化培地）で育てられる。いくつかの実施形態において、第１の細胞溶液からの細胞は培地（例えば同位体富化培地）で育てられる。いくつかの実施形態において、第１の細胞溶液と第２の細胞溶液の両方からの細胞は、第１の細胞溶液からの細胞が第２の細胞溶液から得られた細胞と区別できるように、２つの異なる同位体富化培地で育てられる。他の実施形態では、細胞溶液の１つのみ（例えば、第１の細胞溶液あるいは第２の細胞溶液のいずれか）からの細胞は、同位体富化培地で育てられる。いくつかの実施形態において、方法は、小分子断片の第１のセットとシステイン反応性プローブの相補的なセットに第１の細胞溶液を接触させる工程をさらに含み、各小分子断片は、システイン残基と結合するために、その相補的なシステイン反応性プローブと競合し、および各小分子断片と各相補的なシステイン反応性プローブは、個々のそれぞれのセット内で異なる。いくつかの実施形態において、方法は、システイン反応性プローブの第２のセットに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含み、ここで、システイン反応性プローブの第２のセットは、システイン反応性プローブの相補的なセットと同じであり、各システイン反応性プローブはセット内で異なる。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブの第１のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第３の群を生成し、システイン反応性プローブの第２のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第４の群を生成する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は生物学的に活性なシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステインと共有結合的に相互作用する小分子断片は、システイン含有タンパク質の活性を損ない、および／または阻害する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は活性型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質の活性型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質はプロアクティブ型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のプロアクティブ型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン残基の構造的な環境は、システイン残基の反応性を調節する。いくつかの実施形態において、構造的な環境は疎水性の環境あるいは親水性の環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は帯電環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は求核環境である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク

質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、転写関連タンパク質、あるいは、翻訳関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、酵素はキナーゼ、プロテアーゼ、あるいは脱ユビキチン化酵素を含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼはシステインプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、システインプロテアーゼはカスパーゼを含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質は血管内皮細胞増殖因子を含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質はレドックスシグナル伝達タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【０００６】

【化１】

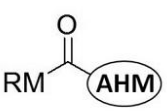


式（I）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は図３において例示される小分子断片である。いくつかの実施形態において、小分子断片は特異的阻害剤あるいはｐａｎ阻害剤である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【０００７】

【化２】



式（II）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基

と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはアルキンあるいはアジド基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、発色団は蛍光色素、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレートあるいは蛍光酵素基質を含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ローダミン、ロドール、フルオレセイン、チオフルオレセイン、アミノフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン、クロロフルオレセイン、メチルフルオレセイン、スルホフルオレセイン、アミノロドール、カルボキシロドール、クロロロドール、メチルロドール、スルホロドール、アミノローダミン、カルボキシローダミン、クロローダミン、メチルローダミン、スルホローダミン、チオローダミン、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニン、シアニン２、シアニン３、シアニン３．５、シアニン５、シアニン５．５、シアニン７、オキサジアゾール誘導体、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾール、ピレン誘導体、カスケードブルー、オキサジン誘導体、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０、アクリジン誘導体、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アリールメチン誘導体、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、テトラピロール誘導体、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビン１－ジメチルアミノナフチル－５－スルホン酸塩、１－アニリノ－８－ナフタレンスルホン酸塩、２－ｐ－トルイジニル－６－ナフタレンスルホン酸塩、３－フェニル－７－イソシアン酸クマリン（ｉｓｏｃｙａｎａｔｏｃｏｕｍａｒｉｎ）、Ｎ－（ｐ－（２－ベンゾオキサゾリル）フェニル）マレイミド、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、フルオレセインｄＴ、５－ＴＡＭＲＡ－カダベリン、２－アミノアクリドン、ＨＥＸ、ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）、ＭＡＸ、ＴＥＴ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＡＲＭＡＴＭ（ＮＨＳエステル）、ＴＥＸ　６１５、ＡＴＴＯ（商標）４８８、ＡＴＴＯ（商標）５３２、ＡＴＴＯ（商標）５５０、ＡＴＴＯ（商標）５６５、ＡＴＴＯ（商標）Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ（商標）５９０、ＡＴＴＯ（商標）６３３、ＡＴＴＯ（商標）６４７Ｎ、ＴＹＥ（商標）５６３、ＴＹＥ（商標）６６５、あるいはＴＹＥ（商標）７０５を含む

。いくつかの実施形態において、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、あるいはその組み合わせである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液は対照をさらに含む。いくつかの実施形態において、対照はジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）である。いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む。いくつかの実施形態において、質量分析方法は液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）方法である。いくつかの実施形態において、方法はタンパク質同定用のアルゴリズムによって質量分析方法からの結果を解析する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、アルゴリズムは、タンパク質同定用のタンパク質配列データベースと質量分析方法からの結果を組み合わせる。いくつかの実施形態において、アルゴリズムはＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム、Ｐｒｏｂｉｔｙ、Ｓｃａｆｆｏｌｄ、ＳＥＱＵＥＳＴ、あるいは、Ｍａｓｃｏｔを含む。いくつかの実施形態において、質量分析方法はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦベースの方法である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質の各々に割り当てられた値は、質量分析解析から得られる。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質の各々に割り当てられた値は、質量電荷比の関数としての信号強度のプロットからの曲線下面積である。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、（ｉ）システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群からのシステイン含有タンパク質に割り当てられた第１の値と、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群からの同じシステイン含有タンパク質の第２の値を位置付けることと、（ｉｉ）同じシステイン含有タンパク質に割り当てられた２つの値の間の比率を計算すること、を含む。いくつかの実施形態において、２を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、３を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、システイン含有タンパク質へのシステイン反応性プローブの阻害の割合を計算することをさらに含む。いくつかの実施形態において、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％を超える、あるいは１００％の阻害の割合は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態では、細胞は腫瘍細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ｒａｍｏｓ、あるいはＪｕｒｋａｔ細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は腫瘍サンプルから得られる。いくつかの実施形態では、サンプルは組織サンプルである。いくつかの実施形態において、方法はインサイツ法である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、４－ヒドロキシノネナールでも、１５－デオキシ－Δ１２，１４－プロスタグランジンＪ２でもない。

【０００８】

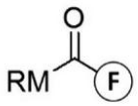
ある実施形態において、システイン含有タンパク質との相互作用のために小分子断片をスクリーニングする方法が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）システイン反応性プローブで処理されたサンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを収集する工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、および、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質と相互に作用するものとして小分子断片を同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、システイン含有タンパク質と相互に作用するものとして、小分子断片を同定する前に、反応性プローブ－タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々に、値を割り当てる工程をさらに含み、ここで値は工程（ｂ）のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、サンプルは第１の細胞溶液と第２の細胞溶液を含む。いくつかの実施形態において、方法はシステイン反応性プ

ローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分以上である。いくつかの実施形態において、方法は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、第１のシステイン反応性プローブと第２のシステイン反応性プローブは同じである。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群と第２の群は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを含む。いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液からの細胞は培地（例えば同位体富化培地）で育てられる。いくつかの実施形態において、第１の細胞溶液からの細胞は培地（例えば同位体富化培地）で育てられる。いくつかの実施形態において、第１の細胞溶液と第２の細胞溶液の両方からの細胞は、第１の細胞溶液からの細胞が第２の細胞溶液から得られた細胞と区別できるように、２つの異なる同位体富化培地で育てられる。他の実施形態では、細胞溶液の１つのみ（例えば、第１の細胞溶液あるいは第２の細胞溶液のいずれか）からの細胞は、同位体富化培地で育てられる。いくつかの実施形態において、方法は、小分子断片の第１のセットとシステイン反応性プローブの相補的なセットに第１の細胞溶液を接触させる工程をさらに含み、各小分子断片は、システイン残基と結合するために、その相補的なシステイン反応性プローブと競合し、および各小分子断片と各相補的なシステイン反応性プローブは、個々のそれぞれのセット内で異なる。いくつかの実施形態において、方法は、システイン反応性プローブの第２のセットに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含み、ここで、システイン反応性プローブの第２のセットは、システイン反応性プローブの相補的なセットと同じであり、各システイン反応性プローブはセット内で異なる。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブの第１のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第３の群を生成し、システイン反応性プローブの第２のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第４の群を生成する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は生物学的に活性なシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステインと共有結合的に相互作用する小分子断片は、システイン含有タンパク質の活性を損ない、および／または阻害する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は活性型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質の活性型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質はプロアクティブ型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のプロアクティブ型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン残基の構造的な環境は、システイン残基の反応性を調節する。いくつかの実施形態において、構造的な環境は疎水性の環境あるいは親水性の環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は帯電環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は求核環境である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関

連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質から選択される。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、転写関連タンパク質、あるいは、翻訳関連タンパク質から選択される。いくつかの実施形態において、酵素はキナーゼ、プロテアーゼ、あるいは脱ユビキチン化酵素を含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼはシステインプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、システインプロテアーゼはカスパーゼを含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質は血管内皮細胞増殖因子を含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質はレドックスシグナル伝達タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１から選択される。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、ＴＩＧＡＲ、ＩＭＰＤＨ２、ＩＤＨ１、ＩＤＨ２、ＢＴＫ、ＺＡＫ、ＴＧＭ２、Ｍａｐ２ｋ７、ＸＰＯ１、Ｃａｓｐ５、Ｃａｓｐ８、ＥＲＣＣ３、Ｐａｒｋ７（トキソプラズマ　ＤＪ－１）、ＧＳＴＯ１、ＡＬＤＨ２、ＣＴＳＺ、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＳＭＡＤ２、ＲＢＰＪ、ＦＯＸＫ１、ＩＲＦ４、ＩＲＦ８、ＧＴＦ３Ｃ１、あるいはＴＣＥＲＧ１である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【０００９】

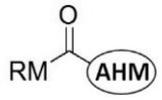
【化３】



式 (I)

ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は図３において例示される小分子断片である。いくつかの実施形態において、小分子断片は特異的阻害剤あるいはｐａｎ阻害剤である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【００１０】
【化４】



式（ＩＩ）

ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ （ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはアルキンあるいはアジド基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、発色団は蛍光色素、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレートあるいは蛍光酵素基質を含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ローダミン、ロドール、フルオレセイン、チオフルオレセイン、アミノフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン、クロロフルオレセイン、メチルフルオレセイン、スルホフルオレセイン、アミノロドール、カルボキシロドール、クロロロドール、メチルロドール、スルホロドール；アミノローダミン、カルボキシローダミン、クロローダミン、メチルローダミン、スルホローダミン、チオローダミン、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニン、シアニン２、シアニン３、シアニン、シアニン３．５、シアニン５、シアニン５．５、オキサジアゾール誘導体、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾール、ピレン誘導体、カスケードブルー、オキサジン誘導体、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０、アクリジン誘導体、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アリールメチン誘導体、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、テトラピロール誘導体、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビン１－ジメチルアミノナフチル－５－スルホン酸塩、１－アニリノ－８－ナフタレンスルホン酸塩、２－ｐ－トルイジニル－６－ナフタレンスルホン酸塩、３－フェニル－７－イソシアン酸クマリン、Ｎ－（ｐ－（２－ベンゾオキサゾリル）フェニル）マレイミド、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨ

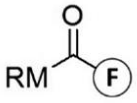
Ｓエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、フルオレセインｄＴ、５－ＴＡＭＲＡ－カダベリン、２－アミノアクリドン、ＨＥＸ、ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）、ＭＡＸ、ＴＥＴ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＡＲＭＡＴＭ（ＮＨＳエステル）、ＴＥＸ　６１５、ＡＴＴＯ（商標）４８８、ＡＴＴＯ（商標）５３２、ＡＴＴＯ（商標）５５０、ＡＴＴＯ（商標）５６５、ＡＴＴＯ（商標）Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ（商標）５９０、ＡＴＴＯ（商標）６３３、ＡＴＴＯ（商標）６４７Ｎ、ＴＹＥ（商標）５６３、ＴＹＥ（商標）６６５、あるいはＴＹＥ（商標）７０５を含む。いくつかの実施形態において、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、あるいはその組み合わせである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液は対照をさらに含む。いくつかの実施形態において、対照はジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）である。いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む。いくつかの実施形態において、質量分析方法はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦベースの方法である。いくつかの実施形態において、質量分析方法は液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）方法である。いくつかの実施形態において、方法はタンパク質同定用のアルゴリズムによって質量分析方法からの結果を解析する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、アルゴリズムは、タンパク質同定用のタンパク質配列データベースと質量分析方法からの結果を組み合わせる。いくつかの実施形態において、アルゴリズムはＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム、Ｐｒｏｂｉｔｙ，　Ｓｃａｆｆｏｌｄ，　ＳＥＱＵＥＳＴ，　あるいは、Ｍａｓｃｏｔを含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質の各々に割り当てられた値は、質量分析解析から得られる。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質の各々に割り当てられた値は、質量電荷比の関数としての信号強度のプロットからの曲線下面積である。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、（ｉ）システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群からのシステイン含有タンパク質に割り当てられた第１の値と、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群からの同じシステイン含有タンパク質の第２の値を位置付けることと、（ｉｉ）同じシステイン含有タンパク質に割り当てられた２つの値の間の比率を計算すること、を含む。いくつかの実施形態において、２を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、３を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、システイン含有タンパク質へのシステイン反応性プローブの阻害の割合を計算することをさらに含む。いくつかの実施形態において、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％を超える、あるいは１００％の阻害の割合は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態では、細胞は腫瘍細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ｒａｍｏｓ、あるいはＪｕｒｋａｔ細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は腫瘍サンプルから得られる。いくつかの実施形態では、サンプルは組織サンプルである。いくつかの実施形態において、方法はインサイツ法である。

【００１１】

ある実施形態において、タンパク質上の生物学的に活性なシステイン部位をマッピングする方法が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）システイン反応性プローブで処理されたサンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを収集する工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、および、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、タンパク質上の生物学的に活性なシステ

イン部位をマッピングする工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプルは第１の細胞溶液と第２の細胞溶液を含む。いくつかの実施形態において、方法はシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分以上である。いくつかの実施形態において、方法は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、第１のシステイン反応性プローブと第２のシステイン反応性プローブは同じである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステインと共有結合的に相互作用する小分子断片は、システイン含有タンパク質の活性を損ない、および／または阻害する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は活性型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質の活性型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質はプロアクティブ型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のプロアクティブ型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン残基の構造的な環境は、システイン残基の反応性を調節する。いくつかの実施形態において、構造的な環境は疎水性の環境あるいは親水性の環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は帯電環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は求核環境である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、転写関連タンパク質、あるいは、翻訳関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、酵素はキナーゼ、プロテアーゼ、あるいは脱ユビキチン化酵素を含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼはシステインプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、システインプロテアーゼはカスパーゼを含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質は血管内皮細胞増殖因子を含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質はレドックスシグナル伝達タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

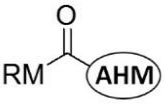
【００１２】
【化５】



式（Ｉ）

ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は図３において例示される小分子断片である。いくつかの実施形態において、小分子断片は特異的阻害剤あるいはｐａｎ阻害剤である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【００１３】
【化６】



式（ＩＩ）

ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親

和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはアルキンあるいはアジド基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、発色団は蛍光色素、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレートあるいは蛍光酵素基質を含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ローダミン、ロドール、フルオレセイン、チオフルオレセイン、アミノフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン、クロロフルオレセイン、メチルフルオレセイン、スルホフルオレセイン、アミノロドール、カルボキシロドール、クロロロドール、メチルロドール、スルホロドール；アミノローダミン、カルボキシローダミン、クロローダミン、メチルローダミン、スルホローダミン、チオローダミン、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニン、シアニン２、シアニン３、シアニン、シアニン３．５、シアニン５、シアニン５．５、オキサジアゾール誘導体、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾール、ピレン誘導体、カスケードブルー、オキサジン誘導体、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０、アクリジン誘導体、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アリールメチン誘導体、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、テトラピロール誘導体、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビン１－ジメチルアミノナフチル－５－スルホン酸塩、１－アニリノ－８－ナフタレンスルホン酸塩、２－ｐ－トルイジニル－６－ナフタレンスルホン酸塩、３－フェニル－７－イソシアン酸クマリン、Ｎ－（ｐ－（２－ベンゾオキサゾリル）フェニル）マレイミド、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、フルオレセインｄＴ、５－ＴＡＭＲＡ－カダベリン、２－アミノアクリドン、ＨＥＸ、ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）、ＭＡＸ、ＴＥＴ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＡＲＭＡＴＭ（ＮＨＳエステル）、ＴＥＸ　６１５、ＡＴＴＯ（商標）４８８、ＡＴＴＯ（商標）５３２、ＡＴＴＯ（商標）５５０、ＡＴＴＯ（商標）５６５、ＡＴＴＯ（商標）Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ（商標）５９０、ＡＴＴＯ（商標）６３３、ＡＴＴＯ（商標）６４７Ｎ、ＴＹＥ（商標）５６３、ＴＹＥ（商標）６６５、あるいはＴＹＥ（商標）７０５を含む。いくつかの実施形態において、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、あるいはその組み合わせである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液は対照をさらに含む。いくつかの実施形態において、対照はジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）である。いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む。いくつかの実施形態において、質量分析方法は液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）方法である。いくつかの実施形態において、方法はタンパク質同定用のアルゴリズムによって質量分析方法からの結果を解析する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、アルゴリズムは、タンパク質同定用のタンパク質配列データベースと質量分析方法からの結果を組み合わせる。いくつかの実施形態において、アルゴリズムはＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム、Ｐｒｏｂｉｔｙ，　Ｓｃａｆｆｏｌｄ，　ＳＥＱＵＥＳＴ，　あるいは、Ｍａｓｃｏｔを含む。いくつかの実施形態において、質量分析方法はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦベースの方法である。いくつかの実施形態では、細胞は腫瘍細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ｒａｍｏｓ、あるいはＪｕｒｋａｔ細胞株から得られる。いくつかの実施形態において、細胞は腫

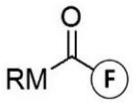
瘍サンプルから得られる。いくつかの実施形態では、サンプルは組織サンプルである。いくつかの実施形態において、方法はインサイツ法である。

【００１４】

ある実施形態において、組成物が本明細書に開示され、該組成物は、式（Ｉ）の小分子断片であって、

【００１５】

【化７】



式 (I)

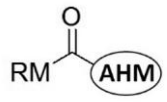
式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である、小分子断片と、システイン含有タンパク質であって、小分子断片へ共有結合している、システイン含有タンパク質、を含む。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。

【００１６】

ある実施形態において、組成物が本明細書に開示され、該組成物は、式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであって、

【００１７】

【化８】



式（ＩＩ）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である、システイン反応性プローブと、システイン含有タンパク質であって、システイン反応性プローブと共有結合している、システイン含有タンパク質、を含む。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。

【００１８】

ある実施形態において、組成物が本明細書に開示され、該組成物は、単離させたサンプルであって、単離させた細胞または組織サンプルである、単離させたサンプルと、単離させたサンプル中で発現されるシステイン含有タンパク質と相互に作用するその能力について分析されるシステイン反応性プローブとを含む。いくつかの実施形態において、組成物

は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体を生成するために、システイン反応性プローブで単離させたサンプルをインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に単離させたサンプルを接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分以上である。

【００１９】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質に共有結合したシステイン反応性プローブを含む、単離させた処理済みの細胞が本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、単離させた処理済の細胞はシステイン反応性プローブのセットをさらに含み、システイン反応性プローブの各々はシステイン含有タンパク質に共有結合されている。

【００２０】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質に共有結合される小分子断片を含む単離させた処理済の細胞が本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、単離させた処理済の細胞は小分子断片のセットをさらに含み、小分子断片の各々はシステイン含有タンパク質に共有結合される。いくつかの実施形態において、単離させた処理済の細胞はシステイン反応性プローブをさらに含む。いくつかの実施形態において、単離させた処理済の細胞はシステイン反応性プローブのセットをさらに含む。

【００２１】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質に共有結合されたシステイン反応性プローブのセットを含む、単離させた処理済みの細胞集団が本明細書で開示される。同様に、実施形態において、システイン含有タンパク質に共有結合された小分子断片のセットを含む単離させた処理済の細胞集団が本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、単離させた処理済の細胞集団はシステイン反応性プローブのセットをさらに含む。

【００２２】

ある実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して少なくとも９０％の配列同一性を含む、単離および精製されたポリペプチドが本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して少なくとも９５％の配列同一性を含む、単離および精製されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して１００％の配列同一性を含む、単離および精製されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択される完全長のアミノ酸配列に対して１００％の配列同一性を含む、単離および精製されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、単離および精製されたポリペプチドはせいぜい５０のアミノ酸長さである。本明細書に記載される単離および精製されたポリペプチドを含む小分子断片をスクリーニングするためのポリペプチドプローブである。

【００２３】

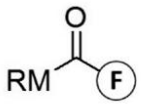
ある実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して少なくとも９０％の配列同一性を含むポリペプチドをコードする核酸が本明細書でさらに開示される。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して少なくとも９５％の配列同一性を含むポリペプチドをコードする核酸である。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対して１００％の配列同一性を含むポリペプチドをコードする核酸である。いくつかの実施形態において、表１－３または８－９から選択される完全長のアミノ酸配列に対して１００％の配列同一性を含むポリペプチドをコードする核酸である。

【００２４】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質のシステイン残基と共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が本明細書で開示され、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【００２５】

【化９】



式（Ｉ）

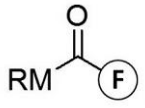
式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００２６】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質のシステイン残基と共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が本明細書で開示され、小分子断片は約１５０ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００のアミノ酸残基長さ、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【００２７】

【化１０】



式（I）

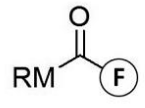
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は、約１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００２８】

ある実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片に細胞溶液を接触させることを含むプロセスによって生成されたシステイン含有タンパク質－小分子断片複合体が本明細書で開示され、

【００２９】

【化１１】



式（I）

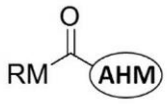
式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分であり、接触する時間は約５分～約２時間の間である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は、約１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００３０】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質のシステイン残基と共有結合しているシステイン反応性プローブを含む修飾されたシステイン含有タンパク質が本明細書で開示され、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【００３１】

【化１２】



式（ＩＩ）

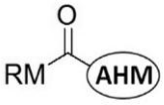
式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００３２】

ある実施形態において、式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブが本明細書で開示され、

【００３３】

【化１３】



式（ＩＩ）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質上のシステイン残基に共有結合する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例

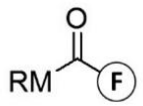
示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００３４】

ある実施形態において、ある方法を使用して同定されたシステイン含有タンパク質に共有結合することができる化合物が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）サンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを得る工程であって、システイン反応性プローブがシステイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質を、化合物の結合標的であるとして同定する工程を含む。いくつかの実施形態では、化合物は小分子断片である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【００３５】

【化１４】



式（I）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ断片ベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ　Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ　３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ　ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｌｉｆｅ　（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　１５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、断片、ＯＴＡＶＡ断片・ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ　ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は図３において例示される小分子断片である。いくつかの実施形態において、小分子断片は特異的阻害剤あるいはｐａｎ阻害剤である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は生物学的に活性なシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシス

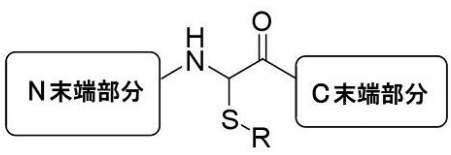
テイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基である。いくつかの実施形態において、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は非活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステインと共有結合的に相互作用する小分子断片は、システイン含有タンパク質の活性を損ない、および／または阻害する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は活性型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質の活性型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質はプロアクティブ型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のプロアクティブ型と相互に作用する。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン残基の構造的な環境は、システイン残基の反応性を調節する。いくつかの実施形態において、構造的な環境は疎水性の環境あるいは親水性の環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は帯電環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は求核環境である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、転写関連タンパク質、あるいは、翻訳関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、酵素はキナーゼ、プロテアーゼ、あるいは脱ユビキチン化酵素を含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼはシステインプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、システインプロテアーゼはカスパーゼを含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質は血管内皮細胞増殖因子を含む。いくつかの実施形態において、シグナル伝達タンパク質はレドックスシグナル伝達タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。

【００３６】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００３７】

【化１５】

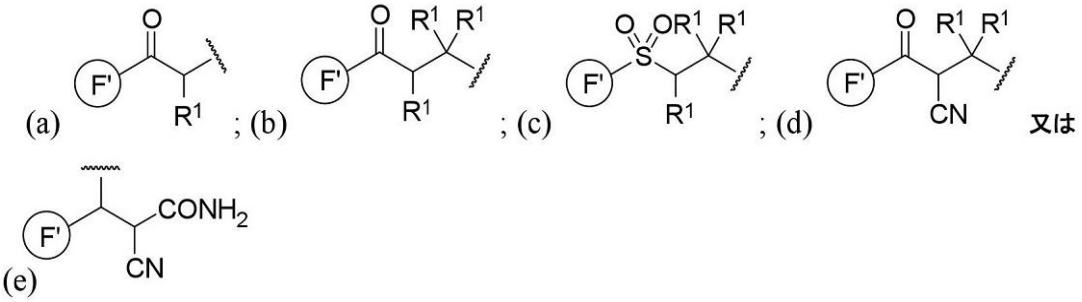


(I)

の構造を有するシステイン含有タンパク質の誘導体であり、ここで、誘導はシステイン残基で生じ、Ｒは、

【００３８】

【化１６】



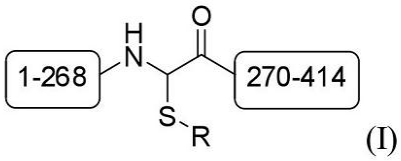
から選択され、ここで、Ｒ^{1}はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、本明細書に記載されるシステイン含有タンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１、２、３、８、あるいは９において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表１において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表２において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表８において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表９において例示されるタンパク質である。

【００３９】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００４０】

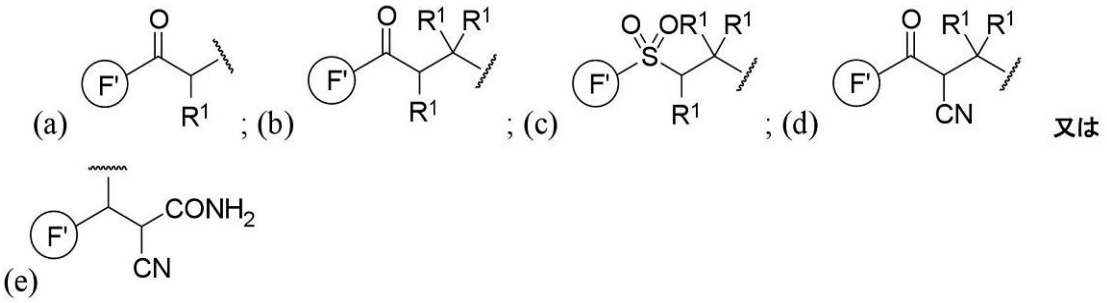
【化１７】



の構造を有するＩＤＨ１タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に基づいてＩＤＨ１システイン残基位置２６９で生じ、Ｒは

【００４１】

【化１８】



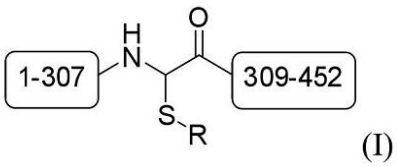
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００４２】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００４３】

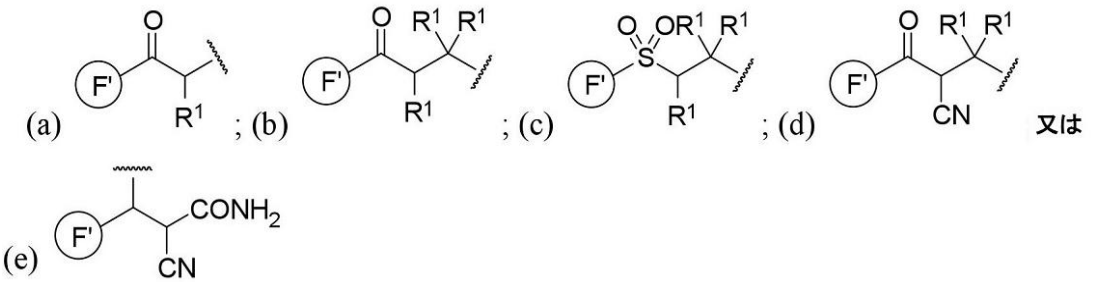
【化１９】



の構造を有するＩＤＨ２タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に基づいてＩＤＨ２システイン残基位置３０８で生じ、Ｒは

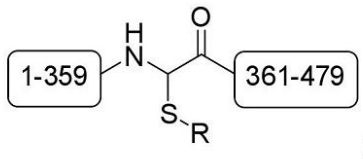
【００４４】

【化２０】



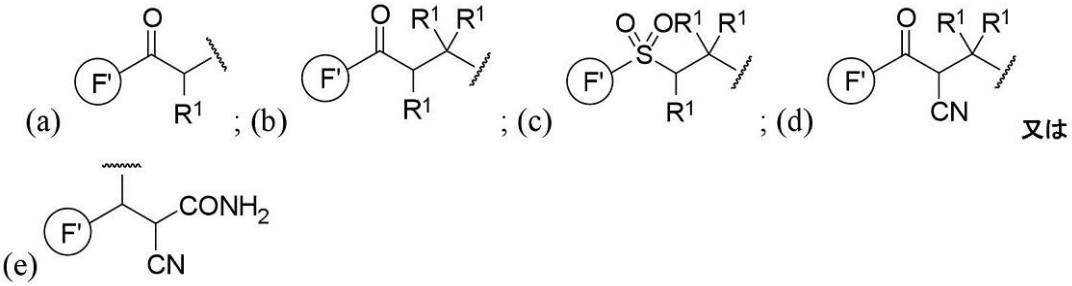
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。

いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。
【００４５】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００４６】
【化２１】

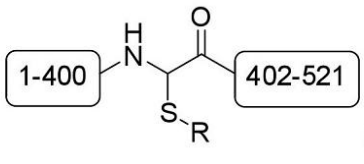


(I)

の構造を有するカスパーゼ－８タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３に基づいてカスパーゼ－８システイン残基位置３６０で生じ、Ｒは
【００４７】
【化２２】



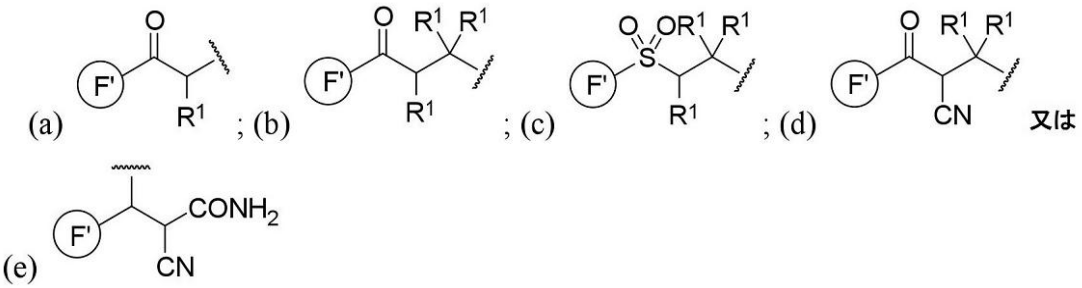
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。
【００４８】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００４９】
【化２３】



(I)

の構造を有するカスパーゼ－１０タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４に基づいてカスパーゼ－１０システイン残基位置４０１で生じ、Ｒは
【００５０】

【化２４】



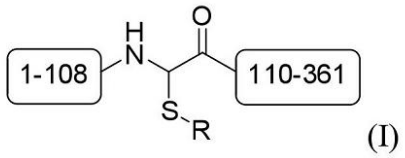
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００５１】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００５２】

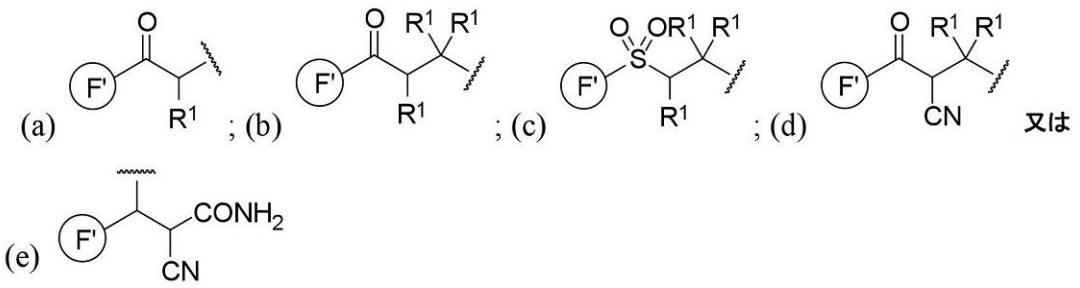
【化２５】



の構造を有するＰＲＭＴ－１タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に基づいてＰＲＭＴ－１システイン残基位置１０９で生じ、Ｒは

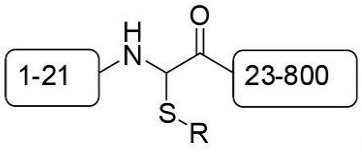
【００５３】

【化２６】



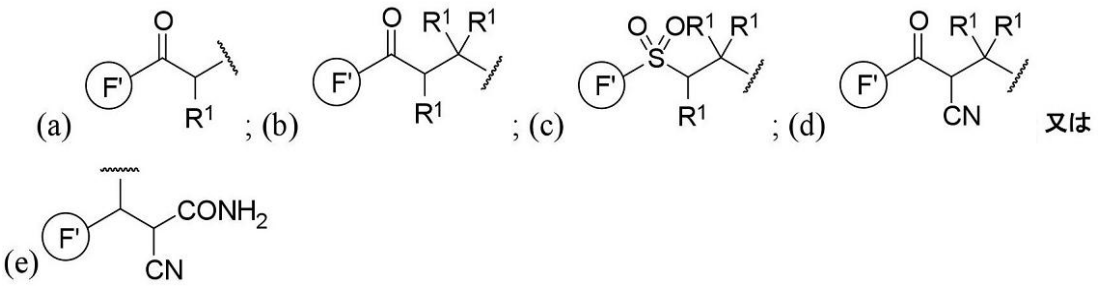
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００５４】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００５５】
【化２７】

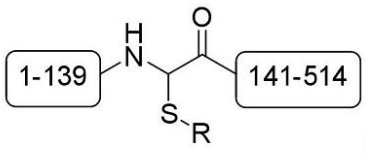


(I)

の構造を有するＺＡＫタンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に基づいてＺＡＫシステイン残基位置２２で生じ、Ｒは
【００５６】
【化２８】



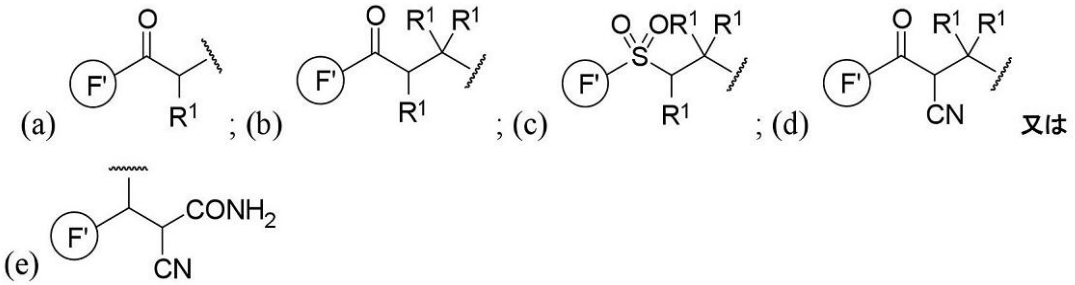
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。
【００５７】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００５８】
【化２９】



(I)

の構造を有するＩＭＰＤＨ２タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７に基づいてＩＭＰＤＨ２システイン残基位置１４０で生じ、Ｒは
【００５９】

【化３０】



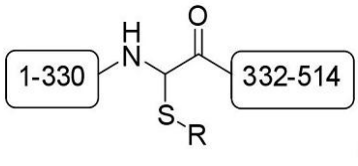
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００６０】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００６１】

【化３１】

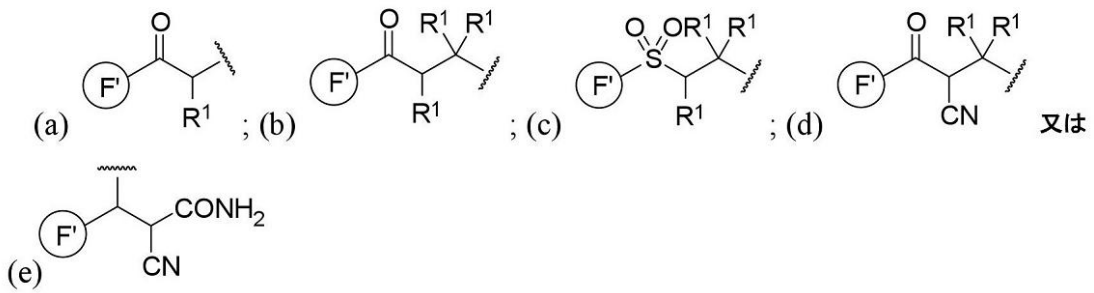


(I)

の構造を有するＩＭＰＤＨ２タンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７に基づいてＩＭＰＤＨ２システイン残基位置３３１で生じ、Ｒは

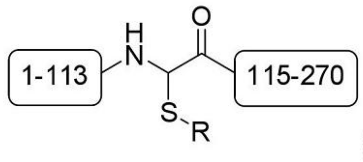
【００６２】

【化３２】



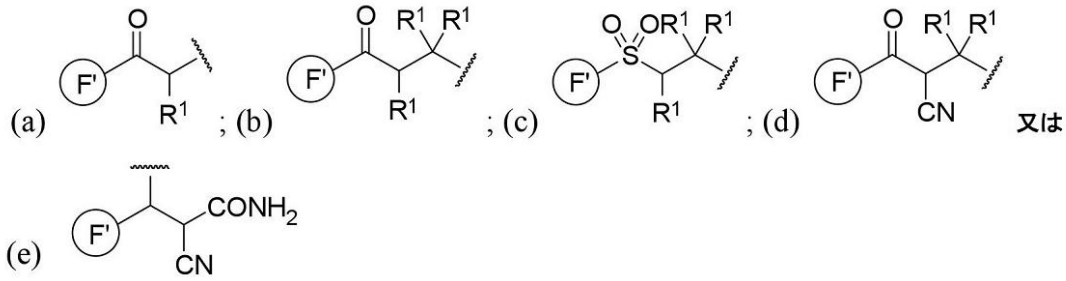
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。

いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。
【００６３】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００６４】
【化３３】

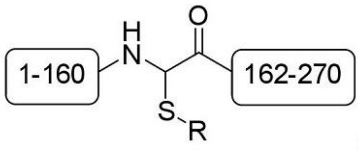


(I)

の構造を有するＴＩＧＡＲタンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱＩＤ　ＮＯ：８に基づいてＴＩＧＡＲシステイン残基位置１１４で生じ、Ｒは
【００６５】
【化３４】



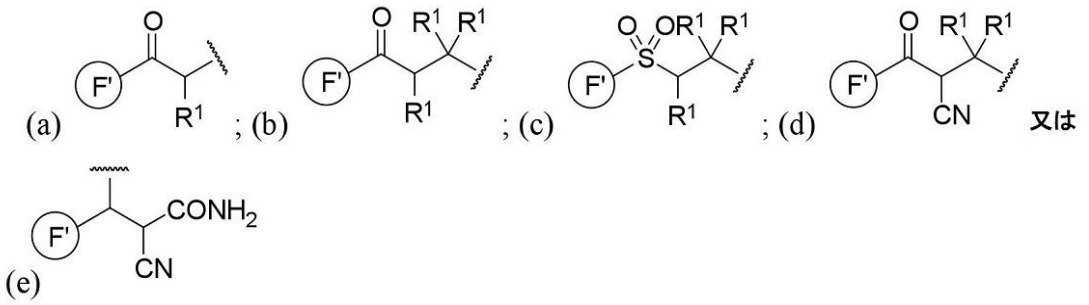
から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。
【００６６】
ある実施形態において、式（Ｉ）
【００６７】
【化３５】



(I)

の構造を有するＴＩＧＡＲタンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱＩＤ　ＮＯ：８に基づいてＴＩＧＡＲシステイン残基位置１６１で生じ、Ｒは
【００６８】

【化３６】



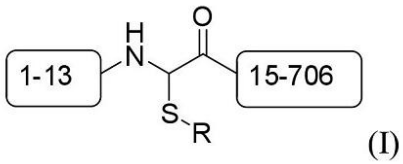
から選択され、ここで、Ｒ^{1}はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００６９】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００７０】

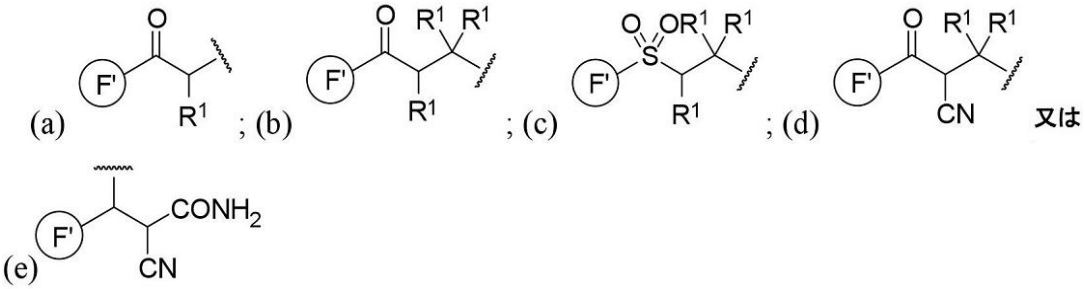
【化３７】



の構造を有するＰＫＣθタンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９に基づいてＰＫＣθシステイン残基位置１４で生じ、Ｒは

【００７１】

【化３８】



から選択され、ここで、Ｒ^{1}はＨ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。

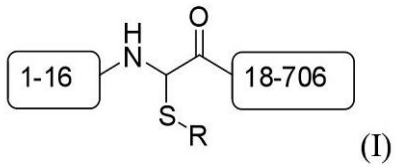
いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

【００７２】

ある実施形態において、式（Ｉ）

【００７３】

【化３９】

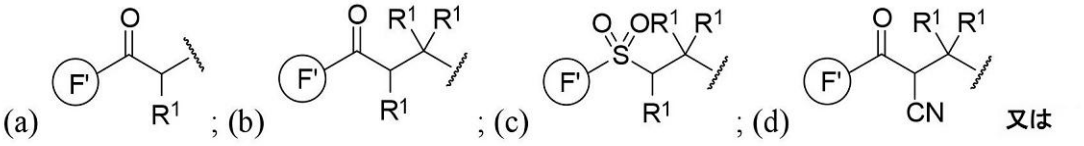


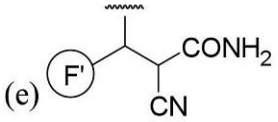
(I)

の構造を有するＰＫＣθタンパク質の誘導体が本明細書で開示され、誘導体はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９に基づいてＰＫＣθシステイン残基位置１７で生じ、Ｒは

【００７４】

【化４０】





から選択され、ここで、Ｒ^{1}はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、Ｆ’は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｆ’の分子量は、ハロゲン、非金属、あるいは遷移金属を用いる富化の前のものである。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。いくつかの実施形態において、Ｆ’は図３において例示される小分子断片部分である。

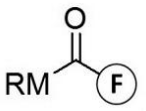
【００７５】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する方法が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）小分子断片とシステイン反応性プローブで処理された第１の細胞溶液を含むサンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを得る工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定するために、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々の値を決定する工程をさらに含み、ここで、値は工程（ｂ）のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、サンプルは第２の細胞溶液をさらに含む。いくつかの実施形態において、方法はシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分以上である。いくつかの実施形態において、方

法は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、第１のシステイン反応性プローブと第２のシステイン反応性プローブは同じである。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群と第２の群は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１、表２、表８、表９、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【００７６】

【化４１】

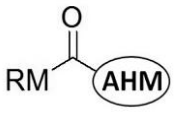


式（I）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ Ｐｌａｔｆｏｒｍ Ｆｒａｇｍｅｎｔベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ （ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＯＴＡＶＡ断片ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ Ｌａｖｏｒａｔｏｒｙの Ａｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【００７７】

【化４２】



式（II）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの実施形態において、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）

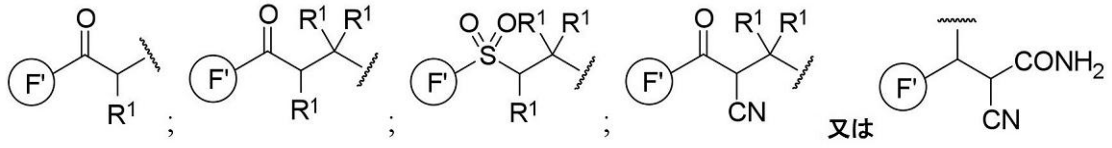
エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、発色団は、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレート、あるいは蛍光酵素基質を含む。いくつかの実施形態において、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、あるいはその組み合わせである。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは図３で例示されるシステイン反応性プローブである。いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、（ｉ）システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群からのシステイン含有タンパク質に割り当てられた第１の値と、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群からの同じシステイン含有タンパク質の第２の値を位置付けることと、（ｉｉ）同じシステイン含有タンパク質に割り当てられた２つの値の間の比率を計算すること、を含む。いくつかの実施形態において、２を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、工程ｃ）における同定は、システイン含有タンパク質へのシステイン反応性プローブの阻害の割合を計算することをさらに含む。いくつかの実施形態において、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％を超える、あるいは１００％の阻害の割合は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの実施形態において、方法はインサイツ法である。いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、４－ヒドロキシノネナールでも、１５－デオキシ－Δ１２，１４－プロスタグランジンＪ２でもない。

【００７８】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質のシステイン残基と共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が本明細書で開示され、小分子断片は約１５０ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３で表示されるシステイン残基部位を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１、表２、表８、表９、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００のアミノ酸残基長さ、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は構造ＳＲを有し、ここで、Ｒは

【００７９】

【化４３】

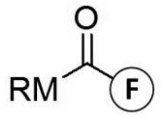


から選択され、ここで、Ｒ[1]はＨ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、あるいはアリールであり、および、Ｆ’は小分子断片部分である。いくつかの実施形態では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン

、またはそれ以上の分子量を有する。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。いくつかの実施形態において、修飾されたシステイン含有タンパク質は、ＩＤＨ２、カスパーゼ－８、カスパーゼ－１０、あるいはＰＲＭＴ１から選択される。いくつかの実施形態において、ＩＤＨ２はシステイン位置３０８で修飾される。いくつかの実施形態において、カスパーゼ－８はシステイン位置３６０で修飾される。いくつかの実施形態において、カスパーゼ－１０は、プロ型（ｐｒｏｆｏｒｍ）で存在し、システイン位置４０１で修飾される。いくつかの実施形態において、ＰＲＭＴ１はシステイン位置１０９で修飾される。いくつかの実施形態において、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり、

【００８０】

【化４４】



式（I）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの実施形態において、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。いくつかの実施形態において、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。いくつかの実施形態において、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【００８１】

ある実施形態において、システイン含有タンパク質との相互作用のために小分子断片をスクリーニングする方法が本明細書で開示され、該方法は、（ａ）小分子断片とシステイン反応性プローブで処理された第１の細胞溶液を含むサンプルからシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを収集する工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、（ｂ）プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程と、および、（ｃ）工程（ｂ）に基づいて、システイン含有タンパク質と相互に作用するものとして小分子断片を同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、小分子断片を、システイン含有タンパク質と相互に作用するものとして同定する前に、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々の値を決定する工程をさらに含み、ここで値は工程（ｂ）のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は表３において例示されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１、表２、表８、表９、表１０Ａ、表１０Ｂ、表１０Ｃ、表１０Ｄ、あるいは表１０Ｅにおいて例示されるタンパク質である。

【図面の簡単な説明】

【００８２】

本発明の様々な態様はとりわけ添付の請求項で説明されている。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が用いられる実施形態を説明する以下の詳細な説明と、以下の添付図面とを引用することによって得られるであろう。

【００８３】

【図１】共有結合断片のプロテオームワイドのスクリーニングを例示する。Ａ：競合ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰの一般的なプロトコル。細胞溶解物または無傷細胞は、断片求電子ま

たはＤＭＳＯであらかじめ処理され、その後、ＩＡアルキンプローブ１と反応させた。その後、断片とＤＭＳＯで処理したサンプルを、銅を媒介としたアジド・アルキン環化付加（ＣｕＡＡＣまたはクリック）ケミストリーによって、同位体で分化したＴＥＶプロテアーゼを切断可能なビオチンタグ［それぞれ軽（赤）と重（青）］に結合させ、混合し、および、ＩＡ標識されたタンパク質をストレプトアビジン結合ビーズによって富化し、トリプシンとＴＥＶを備えたビーズ上で段階的に温浸させることでＭＳ分析用のＩＡ標識されたペプチドを得た。競合比率（すなわち、Ｒ値）は、ＤＭＳＯ処理された（重いあるいは青）サンプル対断片で処理された（軽いまたは赤）サンプルにおけるＩＡ標識されたペプチドのＭＳ１イオンピークを分割することにより測定される。Ｂ：反応（求電子）基と結合基がそれぞれ緑と黒に色づけされた、求電子の断片ライブラリーの代表的なメンバー。Ｃ：ＩＡローダミンプローブ（１６）を使用する断片のプロテオミクス反応性の当初の解析。Ｒａｍｏｓ細胞からの溶解可能なプロテオームを、１時間指示された断片（各々５００μＭ）で処理し、その後、ＩＡローダミン（１μＭ、１時間）で標識し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングによって分析する。１つ以上の断片（星印）のある状態でＩＡローダミンとの反応性が損なわれていることを示す複数のタンパク質が同定された。蛍光ゲルはグレイスケールで示される。Ｄ：以下の断片（各々５００μＭ）であらかじめ処理されたＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の溶解可能なプロテオーム中の断片－システイン相互作用の競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ分析：３，５－ジ（トリフルオロメチル）アニリンクロルアセトアミド３、アクリルアミド１４、およびアセトアミド１７．断片に関するプロテオミクス反応値、あるいはリガンド結合したシステイン比率を、ＤＭＳＯ／断片（重／軽）比較においてＲ値≧４で総システインの割合として計算した。Ｅ：ローダミン－アジドタグを用いるＣｕＡＣＣと、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびゲル内蛍光スキャニングによる解析によって検知される、アクリルアミド１８およびクロルアセトアミド１９のクリックプローブを用いたＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解可能なプロテオームの濃度依存的な標識化。Ｆ：断片３、４、および２３の１つによって（あるいは、ＰＨＧＤＨ　Ｃ３６９の場合には、３つのすべての断片によって）選択的に標的とされるリガンド結合したシステインを特徴づける、断片３、４、および２３で行われた競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からの代表的なＭＳ１ペプチド・イオン・クロマトグラム。

【図２】本明細書に記載される方法を処理するために使用される典型的なコンピュータサーバーの概念図を例示する。

【図３】断片求電子ライブラリーの組成物と、追加のツール化合物、クリックプローブ、および断片の構造を示す。

【図４】ヒト細胞溶解物中の競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって決定された断片求電子のプロテオミクス反応性の解析を例示する。Ａ：断片求電子で行われた完全なセットの競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験中のすべてのシステインの定量化の頻度。解釈のために少なくとも３つのｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰデータセットでシステインを定量化する必要があったことに留意されたい。Ｂ：各断片についてＲ値≧４のすべての定量化されたシステインの割合として計算された断片のプロテオミクス反応値（あるいはリガンド結合したシステイン率）の順位。大部分の断片を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１および／またはＲａｍｏｓ細胞溶解物での２－４回の反復実験で評価し、そのプロテオミクス反応値を、複製についての平均±ＳＥＭ値として報告する。Ｃ：細胞溶解物中の５００μＭ対２５μＭでスクリーニングされた代表的な断片のプロテオミクス反応性の比較。Ｄ：ＲａｍｏｓとＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物の両方で試験された断片に関するプロテオミクス反応値の比較。Ｅ：少なくとも３つの独立した複製で試験された代表的な断片のプロテオミクス反応値の平均±ＳＥＭデータ。Ｆ：代表的な断片求電子に関する相対的なＧＳＨ反応性。ＧＳＨ（１２５μＭ）の消費は、指定された断片（５００μＭ）を用いる１時間のインキュベーション後に、エルマン試薬（５ｍＭ）を使用して測定された。Ｇ：一般的な結合要素に結合した様々な求電子基を所有する断片求電子（５００μＭ）用のプロテオミクス反応値。

【図５】断片求電子によってリガンド結合したシステインとタンパク質の解析を例示する。Ａ：競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験における断片求電子によってリガンド結合さ

れたすべての定量化システインとタンパク質の画分Ｂ：ＤｒｕｇＢａｎｋで見られるリガンド結合したタンパク質の画分。Ｃ：リガンド結合したシステインを含むＤｒｕｇＢａｎｋおよび非ＤｒｕｇＢａｎｋのタンパク質の機能別の区分。Ｄ：Ｕｎｉｐｒｏｔデータベースからの残基アノテーションに基づくリガンド結合したおよびリガンド結合していないシステインの機能的な分類。Ｅ：ＩＡアルキンプローブを用いた、その固有の反応性に応じたシステインのリガンド性（ｌｉｇａｎｄａｂｉｌｉｔｙ）の比較。システイン反応値はＷｅｅｒａｐａｎａ，　ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔｕｒｅ　４６８，　７９０－７９５　（２０１０）から得た。ここでは、より低い比率がより高いシステイン反応性に相当する。個々のシステインはＸ軸上でプロットされ、左のＹ軸で示される反応性によって分類された。５０のステップサイズの移動平均は、各反応性ビン内のリガンド結合したシステインの割合（右のＹ軸に示されたパーセント値）について青で示されている。Ｆ：ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって測定されたタンパク質毎にリガンド結合して定量化されたシステインの数。１つのタンパク質当たりのリガンド結合した定量化されたシステインについて１と３のそれぞれの平均値は、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって測定された。Ｇ：ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたＸＰＯ１の６つのシステインに関するＲ値で、このタンパク質中の最もリガンド結合したシステインとしてＣ５２８を同定している。各点は、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化された特徴的な断片－システイン相互作用を表す。

【図６】断片－システイン相互作用の解析を例示する。Ａ：プロテオミクス反応値によって組織された代表的なシステインと断片のＲ値（高→低、左→右）と、個々のシステインに関する断片のヒットの割合（高→低、上→下）を示すヒートマップ。Ｒ値≧４は断片ヒット（カラーの中程度の青色～濃青色）を指定する。白色は、検知されなかった（ＮＤ）断片－システイン相互作用を指定する。Ｂ、Ｃ：すべての７６８のリガンド結合したシステイン（Ｂ）について、あるいは、そのＸ線および／またはＮＭＲ構造が報告されている（あるいは、酵素の近縁の相同体について報告されている）酵素で見られるリガンド結合したシステインについて（Ｃ）ヒットした（Ｒ≧４）断片の割合を描くヒストグラム。Ｄ：群Ａ（赤）またはＢ（青）の断片、あるいは両方の群ＡとＢの断片（黒）により標的とされたリガンド結合したシステインの割合。すべてのリガンド結合したシステイン、活性な酵素と非活性部位のリガンド結合したシステイン、および転写因子／制御因子におけるリガンド結合したシステインについて示されている。Ｃ、Ｄについて、活性部位システインは、確立された活性部位残基、および／または酵素構造中の結合した基質／阻害剤から＜１０Åに存在するものとして定義された。Ｅ：ＸＰＯ１（ＰＤＢ　ＩＤ：３ＧＢ８）について示された反応的なドッキングの予測の代表的な例。接近できるシステインをすべて同定し、各々の入手可能なシステインに集中させた２５Åのドッキングキューブ内のライブラリーからのすべての断片を用いて反応的なドッキングを行った。結合したドッキングとｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰの結果に基づいたＸＰＯ１システインのカテゴリーが示されている。Ｆ：２９の代表的なタンパク質中でｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって同定されたリガンド結合したシステインについての反応的なドッキングの予測の成功率。

【図７】競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験における断片求電子によりリガンド結合したシステインの解析を例示する。Ａ：抗癌剤イブルチニブによって標的とされることが知られている２つのシステイン、ＢＴＫのＣ４８１とＭＡＰ２Ｋ７のＣ１３１を含むペプチド用の代表的なＭＳ１イオンクロマトグラム。Ｒａｍｏｓ細胞を、イブルチニブ（１μＭ、１ｈ、赤い跡）あるいはＤＭＳＯ（青い跡）で処理され、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって評価された。Ｃ：Ｘ線および／またはＮＭＲ構造が報告されている（あるいは酵素の近縁の相同体について報告されている）酵素の活性部位および非活性部位で見られるリガンド結合したシステインの総数。Ｃ：複数の断片求電子によって標的とされた単一のリガンド結合したシステインＣ３６９を同定する、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたＰＨＧＤＨ中の８つのシステインのＲ値。各点は、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化された特徴的な断片－システイン相互作用を表す。Ｄ：キナーゼの活性部位と非活性部位で見られるリガンド結合したシステインのための代表的な断片相互作用を示すヒー

トマップ。Ｅ：キナーゼ中の活性部位と非活性部位のシステインのための断片ヒット率を示すヒストグラム。Ｆ：グループＡのみ、グループＢのみ、あるいはグループＡとＢの両方の化合物によって標的とされたキナーゼ中のリガンド結合したシステインの割合。Ｇ：転写因子／制御因子で見られるリガンド結合したシステインのための代表的な断片相互作用を示すヒートマップ。Ｈ：ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において定量化された反応的なドッキングによってリガンド結合可能な（ｌｉｇａｎｄａｂｌｅ）または可能ではないと予想されるシステインの画分。

【図８】断片－システイン相互作用の確認と機能解析を例示する。Ａ：対照断片３ではなく断片１１によるＣ１０９のＩＡ－アルキン標識の遮断を示す、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞溶解物の競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験で定量化されたＰＲＭＴ１からの指定されたシステイン含有ペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。Ｂ：組み換え型の精製されたＷＴ－ＰＲＭＴ１（ＨＥＫ２９３Ｔ細胞溶解物へ添加された１μＭのタンパク質）の３ではなく１１の遮断されたＩＡローダミン（２μＭ）標識化。Ｃ１０９Ｓ－ＰＲＭＴ１突然変異体がＩＡローダミンとは反応しなかったことに注意する。Ｃ：１１によるＰＲＭＴ１の１６標識化の遮断に関するＩＣ$_{50}$曲線。ＣＩ：９５％の信頼区間。Ｄ：組み換えＰＲＭＴ１による組み換えヒストン４のメチル化に対する１１と対照断片３の効果。同様の結果をもたらした３つの独立した実験の１つの代表的な実験が示される。Ｅ：以前に報告されたイブルチニブ由来の活性プローブ５９（上のパネル）によって組み換えＭＬＴＫ（あるいはＺＡＫ）キナーゼの対照断片３（各断片の５０μＭ）ではなく６０の遮断された標識化。Ｃ２２Ａ－ＭＬＴＫ突然変異体はイブルチニブ・プローブとは反応しなかった。抗ＦＬＡＧブロッティングは、ＷＴ－ＭＬＴＫとＣ２２Ａ－ＭＬＴＫのタンパク質の同様の発現を確認した。これはＨＥＫ２９３Ｔ細胞中のＦＬＡＧ融合タンパク質として発現された（下のパネル）。Ｆ：６０によるＭＬＴＫのイブルチニブ・プローブ標識化の遮断のＩＣ$_{50}$曲線。Ｇ：対照断片３（各断片の１００μＭ）ではなく６０は、Ｃ２２Ａ－ＭＬＴＫではなくＷＴ－ＭＬＴＫのキナーゼ活性を阻害した。Ｈ：Ｃ１４０Ｓ－ＩＭＰＤＨ２（あるいはＣ１４０Ｓ／Ｃ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２）ではなく、クリックプローブ１８（２５μＭ）標識されたＷＴ－ＩＭＰＤＨ２とＣ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２。標識化は、ローダミン・アジド・リポーター・タグへのＣｕＡＡＣ結合とＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングによる解析によって検知された。組み換えＩＭＰＤＨ２　ＷＴと突然変異体は大腸菌から発現・精製され、１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまでＪｕｒｋａｔ溶解物に加えられた。Ｉ：組み換えＷＴ－ＩＭＰＤＨ２（各ヌクレオチドの５００μＭ）の１８標識化のためのヌクレオチド競合プロフィール。Ｊ：ＡＴＰによるＩＭＰＤＨ２の１８標識化の遮断のＩＣ$_{50}$曲線。Ｋ：組み換え型の精製されたＣ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲ（Ｒａｍｏｓ細胞溶解物へ添加された２μＭタンパク質）の対照断片３ではなく、５の遮断されたＩＡローダミン（２μＭ）標識化。Ｌ：５によるＣ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲのＩＡローダミン標識化の遮断のＩＣ$_{50}$曲線。Ｍ：対照断片３（各断片の１００μＭ）ではなく５が、Ｃ１１４Ｓ－ＴＩＧＡＲあるいはＣ１１４Ｓ／Ｃ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲではなく、ＷＴ－ＴＩＧＡＲ（Ｃ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲ）の触媒活性を阻害した。パネルＣ、Ｆ、Ｇ、Ｉ、Ｊ、Ｌ、およびＭについて、データは、少なくとも３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表す。統計的有意性を、ＤＭＳＯで処理したサンプルを断片で処理したサンプルと比較する独立スチューデントｔ検定で計算した；＊＊，ｐ＜０．０１、・・・・，ｐ＜０．０００１．

【図９】断片－システイン相互作用の確認と機能解析を例示する。Ａ：断片４あるいは対照断片３（各々５００μＭ）で処理されたＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたリガンド結合したシステインＣ２２を含むＭＬＴＫトリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１イオンクロマトグラム。Ｂ：指定された断片で、その後、１０μＭのイブルチニブ誘導体活性プローブ５９で処理されたＷＴ－ＭＬＴＫあるいはＣ２２Ａ－ＭＬＴＫを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞からの溶解物。　５９によるＭＬＴＫ標識は、ローダミン・アジド・タグへのＣｕＡＡＣ結合と、ＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングによる解析によって検知された。Ｃ：指定された断片（各々５００μＭ

）で処理済みの細胞溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化された、触媒性のシステインＣ３３１とＢａｔｅｍａｎドメインシステインＣ１４０を含むＩＭＰＤＨ２トリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１イオンクロマトグラム。Ｄ：Ｃ３３１（赤い範囲）、リバビリン一リン酸塩、およびＣ２－ミコフェノール酸アデニンジヌクレオチド（青）、およびＣ１４０（黄色の範囲）の位置を示す、ヒトＩＭＰＤＨ２（ＰＤＢ　ＩＤ：１ＮＦ７）（薄い灰色）の構造と、ＩＴＡＳＳＥＲによってモデル化されたその構造的に解明されていないＢａｔｅｍａｎドメイン（濃い灰色）。Ｅ：１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまでＪｕｒｋａｔ溶解物に添加された組み換え型の精製されたＩＭＰＤＨ２による断片反応性。このとき、クリックプローブ１８（２５μＭ；１８の構造については図８Ｈを参照）を使用して、競合アッセイで反応性が検知された。１８がＣ１４０ＳあるいはＣ１４０Ｓ／Ｃ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２ではなく、ＷＴ－ＩＭＰＤＨ２とＣ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２と反応したことに注意する。Ｆ：１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまで細胞溶解物に加えられたＷＴ－ＩＭＰＤＨ２の１８（２５μＭ）標識化のヌクレオチド競合。Ｇ：指定された断片（各々５００μＭ）で処理済みの細胞溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたＣ１１４とＣ１６１を含むＴＩＧＡＲトリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。Ｈ：Ｃ１１４（赤い範囲）、Ｃ１６１（黄色の範囲）、および無機リン酸塩（青）を示す、ＴＩＧＡＲ（ＰＤＢ　ＩＤ：３ＤＣＹ）の結晶構造。Ｉ：ＩＡローダミン（２μＭ）プローブによる、組み換え型の精製されたＴＩＧＡＲ、および突然変異タンパク質の標識化。ＴＩＧＡＲタンパク質は２μＭのタンパク質の終濃度に達するまで細胞溶解物に加えられた。Ｊ：５によるＷＴ－ＴＩＧＡＲの濃度依存性の阻害。Ｃ１４０Ｓ－ＴＩＧＡＲ突然変異体が５によって阻害されなかったことに注意する。データは、各濃度での４回の反復実験の平均値±ＳＥＭを表す。

【図１０】断片求電子のインサイツ活性を例示する。Ａ：Ｃ２６９と　癌において頻繁に変異した残基Ｒ１３２との位置を示す、ＩＤＨ１（ＰＤＢ　ＩＤ：３ＭＡＳ）のＸ線結晶構造。Ｂ、Ｃ：それぞれ２μＭあるいは４μＭのタンパク質の終濃度へ達するまで細胞溶解物に加えられた組み換え型の精製されたＷＴ－ＩＤＨ１（Ｂ）あるいはＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１（Ｃ）との２０および対照断片２の反応性。断片反応性はＩＡローダミン・プローブ（２オＭ）を使用して、競合アッセイで検知された；Ｃ１０９Ｓ－ＰＲＭＴ１突然変異体がＩＡローダミンとは反応しなかったことに注意する。Ｄ：断片２０（２５μＭ）で処理したＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたリガンド結合したシステインＣ２６９とリガンド結合していないシステインＣ３７９を含むＩＤＨ１トリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１イオンクロマトグラム。Ｅ：ＧＦＰ（ｍｏｃｋ）をあるいはＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１タンパク質を安定的に過剰発現するＭＵＭ２Ｃ細胞のウエスタンブロット。Ｆ：２０あるいは対照断片２（５０μＭ、２ｈ、インサイツ）で処理したＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ－発現ＭＵＭ２Ｃ溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたリガンド結合したシステインＣ２６９とリガンド結合していないシステインＣ３７９を含むＩＤＨ１トリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。

【図１１】断片求電子のインサイツ活性を例示する。Ａ：代表的な断片求電子によるＷＴ－ＩＤＨ１の１６の標識化の遮断。組み換え型の精製されたＷＴ－ＩＤＨ１が２μＭの終濃度でＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物に加えられ、指定された濃度で断片により、その後、ＩＡローダミンプローブ１６（２μＭ）により処理され、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびゲル内蛍光スキャニングによって解析された。ＩＤＨ１のＣ２６９Ｓ突然変異体がＩＡローダミン１６で標識されなかったことに注意する。Ｂ：２０によるＩＤＨ１のＩＡローダミン標識化の遮断のＩＣ$_{50}$曲線。対照断片２がはるかに低い活性を呈したことに注意する。Ｃ：２ではなく２０が、ＮＡＤＰＨ産生の増加（３４０ｎｍの吸光度）によって測定されるようなα－ケトグルタル酸塩（α－ＫＧ）に対するＩＤＨ１で触媒されたイソシトラートの酸化を阻害した。　２０はＣ２６９Ｓ－ＩＤＨ１突然変異体を阻害しなかった。Ｄ：Ｒ１３２Ｈ－ＩＤＨ１による２０の抑制されたｏｎｃｏｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ　２つのヒドロキシグルタラート（２－ＨＧ）産生）。発癌性のＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１突然変異体を安定的に過剰発現するＭＵＭ２Ｃ細胞、あるいは対照のＧＦＰ発現ＭＵＭ２Ｃ細胞を、指定

された断片（２ｈ、インサイツ）で処理した。細胞を収集し、溶解し、α－ＫＧおよびＮＡＤＰＨからの２－ＨＧのＩＤＨ１依存性の産生はＬＣ－ＭＳによって測定され、それからＧＦＰ発現ＭＵＭ２Ｃ細胞の２－ＨＧ産生が引かれた（ＧＦＰ発現ＭＵＭ２Ｃ細胞はＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１発現ＭＵＭ２Ｃ細胞によって生成された２－ＨＧの＜１０％を生成した）。Ｅ：個々の断片のプロテオミクス反応値はインビトロとインサイツで比較可能である。赤でマークされた１つの断片（１１）は、インサイツＶＳインビトロで顕著に低い反応性を示した。図１Ｄでのように反応値を計算した。破線は、断片求電子に関してインビトロとインサイツでのプロテオミクス反応値の比較のための９０％予測区間を示す。青と赤の円は、これらの予測区間をそれぞれ上回る（またはちょうど）または下回る断片を示す。Ｆ：さらにインサイツでリガンド結合した、インビトロでリガンド結合したシステインの画分。インビトロで判定された個々の断片のリガンド結合したシステイン数と、対応するインサイツの断片によってリガンド結合したこれらのシステインの画分が示される。Ｇ：インビトロではなくインサイツで断片によって選択的に標的とされた代表的なシステイン。インサイツに制限された断片－システイン相互作用については、親タンパク質中の第２のシステインは、不変の比率（Ｒ～１）で検知され、ゆえに、タンパク質発現の潜在的な断片により引き起こされる変化を制御した。パネルＢ－Ｄについては、データは、少なくとも３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表す。統計的有意性を、ＤＭＳＯで処理したサンプルを断片で処理したサンプルと比較する独立スチューデントｔ検定で計算した；・・・・，ｐ＜０．０００１．

【図１２】プロＣＡＳＰ８を標的とする断片求電子を例示する。Ａ：断片４（２５０μＭ；インビトロ；１００μＭ、インサイツ）および対照断片２１（５００μＭ；インビトロ；２００μＭ、インサイツ）で処理済みの細胞溶解物または細胞中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化された触媒性のシステインＣ３６０を含むＣＡＳＰ８トリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。Ｂ：細胞溶解物に加えられた組み換え型の精製された活性型ＣＡＳＰ８との断片反応性。このとき、反応性は、カスパーゼ活性プローブＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２μＭ、１ｈ）を使用して競合アッセイで検知された。Ｃ：ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ｊｕｒｋａｔ、およびＣＡＳＰ８欠損Ｊｕｒｋａｔプロテオームからのプロテオームのウエスタンブロット。ＣＡＳＰ８だけがこれらの細胞中で酵素前駆体の形態で見つかったことを示す。Ｄ：１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまで細胞溶解物に加えられた、組み換え型の精製されたプロＣＡＳＰ８（Ｄ３７４Ａ、Ｄ３８４Ａ、Ｃ４０９Ｓ）との断片反応性。このとき、反応性はＩＡローダミン・プローブ（２μＭ）を用いる競合アッセイで検知された。システイン－３６０とシステイン－４０９の両方のセリンへの突然変異は、ＩＡローダミンによってプロＣＡＳＰ８の標識化を防いだことに注意する。Ｅ：１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまで細胞溶解物に加えられた組み換え型の精製されたプロＣＡＳＰ８（Ｄ３７４Ａ、Ｄ３８４Ａ）との、クリックプローブ６１の濃度依存性の反応性。７によるあらかじめの処理はプロＣＡＳＰ８との６１の反応性を遮断し、セリンへのＣ３６０の突然変異は６１によるプロＣＡＳＰ８の標識化を妨げたことに注意する。Ｆ：断片７と６２は、１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまでＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞溶解物に加えられる、組み換え型の精製された活性型ＣＡＳＰ８と活性型ＣＡＳＰ３のＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２μＭ）による標識化を阻まなかった。Ｇ：７あるいは６２（５０μＭ、１ｈ）で処理されたＪｕｒｋａｔ細胞溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたＣＡＳＰ８（Ｃ３６０）、ＣＡＳＰ２（Ｃ３２０）、および、ＣＡＳＰ７（Ｃ１８６）の触媒性のシステインを含むトリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。Ｈ：６１の１０μＭ対１００μＭで処理済みの細胞溶解物中のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって定量化されたＣ３６０を含むＣＡＳＰ８トリプシンペプチド用の代表的なＭＳ１クロマトグラム。６１（黒）により修飾され、かつＴＥＶ切断可能タグ（赤）に結合した、ＣＡＳＰ８　Ｃ３６０トリプシンペプチド付加物（青）の構造。下線はアイソトープ修飾の部位を示す。図はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６４を開示する。

【図１３】プロＣＡＳＰ８を標的とする断片求電子を例示する。Ａ：プロＣＡＳＰ８の７で遮断されたＩＡローダミン１６標識化。１μＭの終濃度でＲａｍｏｓ細胞溶解物に加えられ、かつ、７、その後、ＩＡローダミン（２μＭ）の指定された濃度で処理された組み換え型の精製されたプロＣＡＳＰ８（この部位でＩＡローダミン標識化を除去するためにＣ４０９Ｓ突然変異を有する）を用いて実験は行われた。プロＣＡＳＰ８のＣ３６０Ｓ／Ｃ４０９Ｓ突然変異体がＩＡローダミンで標識されなかったことに注意する。Ｂ：７によるプロＣＡＳＰ８のＩＡローダミン標識化の遮断のＩＣ$_{50}$曲線。Ｃ：ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって測定されるような細胞溶解物中の内因性のＣＡＳＰ８のＣ３６０の７（５０μＭ）で完全に競合されたＩＡアルキン標識化。代表的なＭＳ１クロマトグラムはＣＡＳＰ８のＣ３６０含有ペプチドについて示される。Ｄ：活性型ＣＡＳＰ８と比較したプロＣＡＳＰ８の７で選択的に遮断されたプローブ標識化。組み換え型のプロＣＡＳＰ８および活性型（ａｃｔｉｖｅ）ＣＡＳＰ８（１μＭの終濃度でＲａｍｏｓ細胞溶解物に各々加えられる）は、７（５０μＭ）あるいは確立されたカスパーゼ阻害剤、Ａｃ－ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２０μＭ）で１時間処理され、その後、プロＣＡＳＰ８のためのクリックプローブ６１（２５μＭ）と、活性型ＣＡＳＰ８のためのＲｈｏ－ＤＥＶＤＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２μＭ）で標識された。ＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングは、７が活性型ＣＡＳＰ８のＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）ではなくプロＣＡＳＰ８の６１による標識化と競合し、反対に、ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）はプロＣＡＳＰ８の６１による標識化ではなく活性型ＣＡＳＰ８のＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）の標識化と競合したことを明らかにした。Ｅ：７も対照断片６２（各々１００μＭ）も、組み換え型の精製された活性型ＣＡＳＰ８とＣＡＳＰ３を阻害せず、これらは、ＤＥＶＤ－ＡＭＣとＩＥＴＤ－ＡＦＣ基質をそれぞれ使用してＲａｍｏｓ細胞溶解物へ追加された後に分析された。ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２０μＭ）は、ＣＡＳＰ８とＣＡＳＰ３の両方の活性を阻害した。Ｆ：ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって測定されるような活性型ＣＡＳＰ８ではなくプロＣＡＳＰ８のＣ３６０の７（３０μＭ）で遮断されたＩＡアルキン標識化。組み換え型のプロＣＡＳＰ８と活性型ＣＡＳＰ８は、１μＭでＲａｍｏｓ溶解物に加えられ、７（３０μＭ）で、その後、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって処理された。Ｇ：アニリン部分のナフチルアミンの置換は、プロＣＡＳＰ８のＣ３６０のＩＡローダミン標識化と競合しなかった対照断片６２を提供する。Ｈ：対照断片６２ではなく７は、内因性ではなく外因性のアポトーシスを遮断した。Ｊｕｒｋａｔ細胞（１５０万個の細胞／ｍＬ）は、スタウロスポリン（２μＭ）またはＳｕｐｅｒＦａｓＬｉｇａｎｄ（商標）（１００ｎｇ／ｍＬ）の添加の前に、３０分間にわたって７あるいは６２（３０μＭ）、あるいは汎カスパーゼ阻害剤ＶＡＤ－ＦＭＫ（１００μＭ）でインキュベートされた。細胞を６時間インキュベートして、生存率をＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ（登録商標）で定量化した。ＲＬＵ－発光量単位。Ｉ：Ｈに記載されるように処理済みの細胞については、ＰＡＲＰ（８９ｋＤａ）、ＣＡＳＰ８（ｐ４３／ｐ４１）、およびＣＡＳＰ３（ｐ１９／ｐ１７）の切断は、ウエスタンブロットによって視覚化された。パネルＢ、Ｅ、およびＤについては、データは、少なくとも３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表す。

【図１４】プロＣＡＳＰ８とプロＣＡＳＰ１０を標的とする求電子化合物を示す。７、６３－Ｒ、あるいは６２で処理し、その後、プローブ６１（１０μＭ、１ｈ）で処理したＪｕｒｋａｔ細胞中で定量的なプロテオミクスによって測定されたカスパーゼのＲ値を示すヒートマップ（Ａ）。Ｊｕｒｋａｔ細胞、あるいは抗ＣＤ３、抗－ＣＤ２８で活性化された原発性ヒトＴ細胞における、ＦａｓＬにより引き起こされたアポトーシスに対する７と６３－Ｒの効果の比較（Ｂ）。Ｂについては、データは、少なくとも３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表し、結果は、様々なヒト被験体からのＴ細胞で行われた複数の実験の代表的なものである。統計的有意性を、ＤＭＳＯで処理したサンプルを断片で処理した

サンプルと比較する独立スチューデントｔ検定で計算した；＊＊＊＊，ｐ＜０．０００１であり、ＪｕｒｋａｔとＴ細胞＃＃＃＃を比較して、ｐ＜０．０００１．
【図１５】ＩＡアルキン標識化（Ｒ＞３未変性／熱変性）によって測定された熱変性に敏感に反応する、リガンド結合した（６２％；５５３の定量化されたシステインのうちの３４１）、およびリガンド結合していない（２０％；２８７０の定量化されたシステインのうちの５６１）システインの画分を例示する。
【図１６】断片３と１４によってリガンド結合され、熱変性（それぞれ６４％（１３３の定量化されたタンパク質標的のうちの８５）と７３％（２６の定量化されたタンパク質標的のうちの１９））に敏感に反応する、対応するクリックプローブ１９と１８によって富化されたものとしてｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによって同定されたタンパク質の割合を示す。１８と１９によるタンパク質富化は、定量的な（ＳＩＬＡＣ）プロテオミクスを使用して、同位体でＳＩＬＡＣと標識されたＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の全タンパク質捕獲によって測定された。
【図１７Ａ】ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ方法またはＩＡアルキンプローブに基づいて予測されるシステインの典型的な画分を例示する。　図１７Ａは、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において定量化された反応的なドッキングによってリガンド結合可能な（ｌｉｇａｎｄａｂｌｅ）またはリガンド結合可能ではないと予測されるシステインの画分を示す。
【図１７Ｂ】ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ方法またはＩＡアルキンプローブに基づいて予測されるシステインの典型的な画分を例示する。図１７Ｂは、ＩＡアルキン・プローブ（Ｒ＞３未変性／熱変性）による感熱性の標識化を示す反応的なドッキングによってリガンド結合可能かあるいはリガンド結合可能ではないと予測されるシステインの画分を示す。
【図１８】指定された断片で、その後、１０μＭのイブルチニブ誘導体活性プローブ５９で処理されたＷＴ－ＭＬＴＫあるいはＣ２２Ａ－ＭＬＴＫを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞からの溶解物を示す。５９によるＭＬＴＫ標識は、ローダミン・アジド・タグへのＣｕＡＡＣ結合と、ＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングによる解析によって検知された。
【図１９】Ｃ１４０Ｓ－ＩＭＰＤＨ２（あるいはＣ１４０Ｓ／Ｃ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２）ではなく、クリックプローブ１８（２５μＭ）で標識されたＷＴ－ＩＭＰＤＨ２とＣ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２を示す。標識化は、ローダミン・アジド・リポーター・タグへのＣｕＡＡＣ結合とＳＤＳ－ＰＡＧＥとゲル内蛍光スキャニングによる解析によって検知された。組み換え型のＩＭＰＤＨ２　ＷＴと突然変異体は大腸菌から発現・精製され、１μＭのタンパク質の終濃度へ達するまでＪｕｒｋａｔ溶解物に加えられた。
【図２０】２０によるＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１のＩＡローダミン標識化の遮断のための明白なIC_{50}曲線を示す。
【図２１Ａ】様々な組み換え型のカスパーゼに関する化合物７と６２の活性を示す。図２１Ａは、７が活性型カスパーゼを阻害しないことを示す。組み換え型の活性型カスパーゼは、２００ｎＭ（ＣＡＳＰ２、３、６、７）あるいは１μＭ（ＣＡＳＰ８、１０）の終濃度へ達するまでのＭＤＡ－ＭＤ－２３１溶解物に加えられ、ｚ－ＶＡＤ－ＦＭＫ（２５μＭ）あるいは７（５０μＭ）により処理され、その後、Ｒｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２μＭ）で標識された。
【図２１Ｂ】様々な組み換え型のカスパーゼに関する化合物７と６２の活性を示す。図２１Ｂは、ＰＡＲＰ（９６ｋＤａ）、ＣＡＳＰ８（ｐ４３／ｐ４１、ｐ１８）、およびＣＡＳＰ３（ｐ１７）の切断のウエスタンブロットを示す。図２１Ｂの中で示されるようなウエスタンブロットによって検知されたＰＡＲＰ、ＣＡＳＰ８、およびＣＡＳＰ３の切断は、３つ（ＳＴＳ）あるいは２つ（ＦａｓＬ）の独立した実験のために定量化された。切断産物（ＰＡＲＰ（９６ｋＤａ）、ＣＡＳＰ８（ｐ４３／ｐ４１）、ＣＡＳＰ３（ｐ１７））を、化合物の処理のために定量化し、ＤＭＳＯで処理されたサンプルに対する％切断を計算した。
【図２１Ｃ】様々な組み換え型のカスパーゼに関する化合物７と６２の活性を示す。図２

１Ｃは、７が内因性ではなく外因性のアポトーシスからＪｕｒｋａｔ細胞を保護することを示す。図２１Ｃについては、ＳＴＳデータは、３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表し、ＦａｓＬデータは、２つの独立した実験の平均値±ＳＤを表す。活性化合物（ＶＡＤ－ＦＭＫと７）を対照化合物６２と比較する独立スチューデントｔ検定を用いて、統計的有意性を計算した；＊＊，ｐ＜０．０１、＊＊＊，ｐ＜０．００１、＊＊＊＊，ｐ＜０．０００１．

【図２２】ＣＡＳＰ１０が原発性のヒトＴ細胞中で内因性のアポトーシスに関与することを示す。Ａ：プローブ６１を使用して、定量的なプロテオミクスによって検知されたカスパーゼのＲ値を示す代表的なＭＳ１ペプチドシグナル。ＡＢＰＰ－ＳＩＬＡＣ実験。Ｊｕｒｋａｔ細胞（１０００万個の細胞）は、２時間ＤＭＳＯ（重い細胞）あるいは指定された化合物（明細胞）のいずれかで処理され、その後、プローブ６１（１０μＭ、１時間）で処理された。Ｂ：７はプロＣＡＳＰ８とＣＡＳＰ１０の６１の標識化と競合するが、６３－Ｒはプロ ＣＡＳＰ８のプローブ標識化を選択的に遮断した。Ｃ：６３－Ｒではなく７は、プロＣＡＳＰ１０のプローブ標識化を遮断する。組み換え型のプロＣＡＳＰ１０は、３００ｎＭの終濃度へ達するまでＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物に加えられ、指定された化合物で処理され、プローブ６１で標識された。触媒性のシステインＣ４０１Ａの突然変異は、６１による標識化を完全に防いだ。Ｄ：７、６３－Ｒ、あるいは６３－ＳによるプロＣＡＳＰ１０の６１による標識化の遮断のための明白なＩＣ$_{50}$曲線。Ｅ：７も６３（各々２５μＭ）も組み換え型の精製された活性型ＣＡＳＰ１０（５００ｎＭ）の活性を阻害せず、これは、蛍光定量的なＡＥＶＤ－ＡＭＣ基質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５９として開示された「ＡＥＶＤ」）を使用して、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物へタンパク質を添加した後に分析された。ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２０μＭ）は、ＣＡＳＰ１０の活性を阻害した。Ｆ：６３－RによるプロＣＡＳＰ８およびプロＣＡＳＰ１０の６１による標識化の遮断に関する明白なＩＣ$_{50}$曲線。Ｇ：６３－Ｒは、プロＣＡＳＰ８に対する効能の増大を示す。組み換え型のプロＣＡＳＰ８は、３００ｎＭの終濃度へ達するまでＭＤＡ－ＭＢ－２３１溶解物に加えられ、指定された化合物で処理され、プローブ６１で標識された。Ｈ：６３－Ｓと比較して、６３－RによるプロＣＡＳＰ８の６１による標識化の遮断に関する明白なＩＣ$_{50}$曲線。６３－Ｓの構造が示される。Ｉ：ＣＡＳＰ１０は、Ｊｕｒｋａｔ細胞と比較して、原発性のヒトＴ細胞の中でより高度に発現される。ＪｕｒｋａｔとＴ細胞溶解物（２ｍｇ／ｍＬ）中の完全長のＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ８、およびＧＡＰＤＨ発現レベルのウエスタンブロット解析。Ｊ：Ｊｕｒｋａｔ細胞（１５０，０００細胞／ウェル）は、スタウロスポリン（２μＭ）またはＳｕｐｅｒＦａｓＬｉｇａｎｄ（商標）（１００ｎｇ／ｍＬ）の添加の前に、３０分間にわたって指定された濃度で７あるいは６３－Ｒでインキュベートされた。細胞を４時間インキュベートして、生存率をＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ（登録商標）で定量化した。Ｋ：Ｊでのように、ただし６３－Ｒあるいは６３－Ｓを用いてＪｕｒｋａｔ細胞を処理した。Ｌ：ＨｅＬａ細胞（２０，０００細胞／ウェル）を播種し、２４時間後、ＳｕｐｅｒＦａｓＬｉｇａｎｄ（商標）（１００ｎｇ／ｍＬ）とシクロヘキシミド（ＣＨＸ、２．５ｎｇ／ｍＬ）の添加前に、３０分間にわたって指定された化合物で処理した。細胞を６時間インキュベートし、生存率をＣＴＧで定量化した。Ｍ：図１４Ｂのように処理したＴ細胞について、ＣＡＳＰ１０（ｐ２２）、ＣＡＳＰ８（ｐ１８）、ＣＡＳＰ３（ｐ１７）、およびＲＩＰＫ（３３ｋＤａ）をウエスタンブロットによって視覚化した。パネルＤ－Ｆ、Ｈ、およびＪ－Ｋについて、データは、少なくとも３つの独立した実験の平均値±ＳＥＭを表す。統計的有意性を、ＤＭＳＯで処理したサンプルを断片で処理したサンプルと比較する独立ステューデントｔ検定で計算した；＊＊，ｐ＜０．０１、・・・・，ｐ＜０．０００１．

【図２３Ａ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ａは、ＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの化学構造を例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される

。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２３Ｂ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ｂ－図２３Ｅは、８時間にわたって、ＤＭＳＯの存在下で、あるいはＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの指定された濃度で、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された（Ｓｔｉｍ）または刺激されていない（Ｕｎｓｔｉｍ）、原発性のヒトＴ細胞における、ＩＬ－２放出（図２３Ｂ）、ＣＤ２５発現（図２３Ｃと図２３Ｄ）、および、ＣＤ６９発現（図２３Ｅ）を例証する棒グラフを例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２３Ｃ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ｂ－図２３Ｅは、８時間にわたって、ＤＭＳＯの存在下で、あるいはＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの指定された濃度で、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された（Ｓｔｉｍ）または刺激されていない（Ｕｎｓｔｉｍ）、原発性のヒトＴ細胞における、ＩＬ－２放出（図２３Ｂ）、ＣＤ２５発現（図２３Ｃと図２３Ｄ）、および、ＣＤ６９発現（図２３Ｅ）を例証する棒グラフを例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２３Ｄ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ｂ－図２３Ｅは、８時間にわたって、ＤＭＳＯの存在下で、あるいはＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの指定された濃度で、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された（Ｓｔｉｍ）または刺激されていない（Ｕｎｓｔｉｍ）、原発性のヒトＴ細胞における、ＩＬ－２放出（図２３Ｂ）、ＣＤ２５発現（図２３Ｃと図２３Ｄ）、および、ＣＤ６９発現（図２３Ｅ）を例証する棒グラフを例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２３Ｅ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ｂ－図２３Ｅは、８時間にわたって、ＤＭＳＯの存在下で、あるいはＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの指定された濃度で、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された（Ｓｔｉｍ）または刺激されていない（Ｕｎｓｔｉｍ）、原発性のヒトＴ細胞における、ＩＬ－２放出（図２３Ｂ）、ＣＤ２５発現（図２３Ｃと図２３Ｄ）、および、ＣＤ６９発現（図２３Ｅ）を例証する棒グラフを例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２３Ｆ】ＤＭＦが原発性のヒトＴ細胞の活性化を阻害することを例示する。図２３Ｆは、ＤＭＦ効果の時間的経過を例証する棒グラフを例示する。Ｔ細胞は、ＤＭＦ処理を始める前に指定された時間にわたって抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激された。細胞はＴ細胞刺激を始めて２４時間後に収集された。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは平均±ＳＥを表す；ｎ＝４－６の実験／群。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。
【図２４】ＤＭＦがＴ細胞生存率に影響しないことを例証する棒グラフを例示する。原発性のヒトＴ細胞は、指定されるように抗ＣＤ３と抗ＣＤ２８抗体で刺激され、８時間にわ

たって化合物で付随的に処理された。その後、細胞をＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ固定可能なブルー染色で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。ＣＤ４＋細胞上でゲート制御されたデータが示される。データは１つの群当たり４回の実験の平均±ＳＥを表す。

【図２５】Ａ－Ｂは、原発性のマウスＴ細胞の活性化を阻害する、ＭＭＦではなくＤＭＦを例証する棒グラフを例示する。脾臓Ｔ細胞をＣ５７ＢＬ／６マウスから収集し、未処理のままにする（Ｕｎｓｔｉｍ）か、８時間ＤＭＳＯの存在下で、あるいは、ＤＭＦ、ＭＭＦ、およびＤＭＳの指定された濃度で、抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激した（Ｓｔｉｍ）。活性化は、ＣＤ２５（Ａ）とＣＤ６９（Ｂ）発現を測定することにより評価された。データは１つの群当たり４回の実験の平均±ＳＥを表す。ＤＭＳＯ群との比較で、＊＊＊ｐ＜０．００１．

【図２６Ａ】ＤＭＦの阻害効果がＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）Ｔ細胞において同等であり、細胞のＧＳＨの減少によって引き起こされないことを例証する棒グラフを例示する。抗ＣＤ３＋抗－ＣＤ２８で刺激されたＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）Ｔ細胞でのＣＤ２５発現を例証する。脾臓Ｔ細胞をＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）マウスから収集し、その後、２４時間にわたって指定された化合物のある状態で刺激した。原発性のヒトＴ細胞をＤＭＳＯ、ＤＭＦ（５０μＭ）、あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ）で処理し、８時間にわたって指定されるように刺激し、その後、ＣＤ２５発現を測定した。データは２回の生物学的複製の平均±ＳＥを表し、１回の生物学的複製当たり３－４回の技術的な複製を伴う。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

【図２６Ｂ】ＤＭＦの阻害効果がＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）Ｔ細胞において同等であり、細胞のＧＳＨの減少によって引き起こされないことを例証する棒グラフを例示する。図２６Ｂと図２６Ｃは、ＤＭＦあるいはＢＳＯによる処理がヒトＴ細胞のＧＳＨ内容物の有意な減少を引き起こすことを例証する。原発性のヒトＴ細胞を抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８抗体で刺激され、ＤＭＦ（５０μＭ、２時間）あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ、４時間）で処理し、その後、細胞内のＧＳＨレベルを測定した。原発性のヒトＴ細胞をＤＭＳＯ、ＤＭＦ（５０μＭ）、あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ）で処理し、８時間にわたって指定されるように刺激し、その後、ＣＤ２５発現を測定した。データは２回の生物学的複製の平均±ＳＥを表し、１回の生物学的複製当たり３－４回の技術的な複製を伴う。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

【図２６Ｃ】ＤＭＦの阻害効果がＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）Ｔ細胞において同等であり、細胞のＧＳＨの減少によって引き起こされないことを例証する棒グラフを例示する。図２６Ｂと図２６Ｃは、ＤＭＦあるいはＢＳＯによる処理がヒトＴ細胞のＧＳＨ内容物の有意な減少を引き起こすことを例証する。原発性のヒトＴ細胞を抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８抗体で刺激され、ＤＭＦ（５０μＭ、２時間）あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ、４時間）で処理し、その後、細胞内のＧＳＨレベルを測定した。原発性のヒトＴ細胞をＤＭＳＯ、ＤＭＦ（５０μＭ）、あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ）で処理し、８時間にわたって指定されるように刺激し、その後、ＣＤ２５発現を測定した。データは２回の生物学的複製の平均±ＳＥを表し、１回の生物学的複製当たり３－４回の技術的な複製を伴う。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

【図２６Ｄ】ＤＭＦの阻害効果がＮｒｆ２（＋／＋）と（－／－）Ｔ細胞において同等であり、細胞のＧＳＨの減少によって引き起こされないことを例証する棒グラフを例示する。図２６Ｄは、ＢＳＯがＴ細胞活性化を変えないことを例証する。原発性のヒトＴ細胞をＤＭＳＯ、ＤＭＦ（５０μＭ）、あるいはＢＳＯ（２．５ｍＭ）で処理し、８時間にわたって指定されるように刺激し、その後、ＣＤ２５発現を測定した。データは２回の生物学的複製の平均±ＳＥを表し、１回の生物学的複製当たり３－４回の技術的な複製を伴う。ＤＭＳＯ群と比較して、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。

【図２７Ａ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。ＤＭＳＯあるいはＤＭＦあるいはＭＭＦ（５０オＭ、４時間）で処理された原発性のヒトＴ細胞中の＞２４００のシステイン残基に関してｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ比率（すな

わちＲ値）を例証するグラフを例示する。図２７Ａと図２７Ｂについて、データは、凝集体が５回の生物学的複製からシステイン残基を定量化したことを表す。１つを超える複製で定量化されたシステイン残基については、平均比率が報告される。破線はＲ値＞４であることをと示しており、これはＤＭＦ感受性のシステイン残基を定義するために用いられた（ＤＭＦで処理されたＴ細胞中のＩＡアルキン反応性の＞４倍の減少）。

【図２７Ｂ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。ＤＭＦ感受性のシステイン残基（ＤＭＳＯ／ＤＭＦについてＲ値＞４）に関する拡張プロフィールを例証するグラフを例示する。図２７Ａと図２７Ｂについて、データは、凝集体が５回の生物学的複製からシステイン残基を定量化したことを表す。１つを超える複製で定量化されたシステイン残基については、平均比率が報告される。破線はＲ値＞４であることをと示しており、これはＤＭＦ感受性のシステイン残基を定義するために用いられた（ＤＭＦで処理されたＴ細胞中のＩＡアルキン反応性の＞４倍の減少）。

【図２７Ｃ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。図２７Ｃと図２７Ｄは、それぞれＴ細胞中のＤＭＦ感受性のシステイン残基の濃度依存性と時間依存性のプロフィールを例証するグラフを例示する。さらなる濃度（１０μＭと２５μＭ）と時間点（１時間と２時間）については、データは、凝集体が１つの群当たり１－３のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からのシステイン残基を定量化したことを表す。

【図２７Ｄ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。図２７Ｃと図２７Ｄは、それぞれＴ細胞中のＤＭＦ感受性のシステイン残基の濃度依存性と時間依存性のプロフィールを例証するグラフを例示する。さらなる濃度（１０μＭと２５μＭ）と時間点（１時間と２時間）については、データは、凝集体が１つの群当たり１－３のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からのシステイン残基を定量化したことを表す。

【図２７Ｅ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。図２７Ｅは、ＤＭＦ感受性システイン残基と少なくとも１つの追加のシステイン残基の両方が定量化されたタンパク質の画分（左）と、追加のシステイン残基が明らかに変化していなかった（ＤＭＳＯ／ＤＭＦについて、Ｒ値＜２．０）これらのタンパク質の画分（右）を例証するチャートを例示する。不明瞭な判定はＤＭＦ感受性システイン残基を含むタンパク質と特徴づけ、このとき、第２のシステインのＲ値は潜在的な変化（２．０と３．９の間のＲ値）の限界証拠を示している。

【図２７Ｆ】ＤＭＦで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証する。図２７Ｆは、ＰＲＫＤＣ中の定量化されたシステイン残基に関する代表的なＭＳ１プロフィールを例示しており、その１つ（Ｃ４０４５）がＤＭＦへの感受性を示している。

【図２８】Ａ－Ｂは、特有の定量化されたペプチド（Ａ）とタンパク質（Ｂ）の総数を例証し、かつ、（４時間にわたって５０μＭのＤＭＦで処理された）原発性のヒトＴ細胞におけるｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験の５回の生物学的複製の後にプラトーに定常に達し始める棒グラフを例示している。

【図２９】ＢＳＯで処理された原発性のヒトＴ細胞のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを例証するグラフを例示する。細胞を４時間２．５ｍＭのＢＳＯで処理した。データは、凝集体が１つの群当たり２回のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からのシステイン残基を定量化したことを表す。

【図３０Ａ】ＤＭＦ感受性システインの保存と機能解析を例証する。マウス中で保存されるヒトＴ細胞プロテオーム中のＤＭＦ感受性システインの画分を例証する。

【図３０Ｂ】ＤＭＦ感受性システインの保存と機能解析を例証する。定量化され、かつマウスＴ細胞中のＤＭＦにも感受性であるヒトＴ細胞中に保存されたＤＭＦ感受性システイン残基の画分を例証する。

【図３０Ｃ】ＤＭＦ感受性システインの保存と機能解析を例証する。機能別の区分によってＤＭＦ感受性システイン残基を内部に持つタンパク質の分布を例証する。

【図３１Ａ】ＤＭＦが、原発性のヒトＴ細胞中の核へのｐ６５転座を阻害することを例証する。ヒトＴ細胞が未処理のままであるか、あるいは抗ＣＤ３と抗ＣＤ２８抗体で刺激され、１時間ＤＭＳＯあるいはＤＭＦ（５０μＭ）で処理されたことを例証する。

【図３１Ｂ】ＤＭＦが、原発性のヒトＴ細胞中の核へのｐ６５転座を阻害することを例証する。ＭＭＦ（５０μＭ）あるいはＤＭＳ（５０μＭ）で処理されたサンプルと同様に、図３１Ａで示されるサンプルに関するｐ６５の核対細胞質の局在化の比率を例証する棒グラフを例示する。
【図３１Ｃ】ＤＭＦが、原発性のヒトＴ細胞中の核へのｐ６５転座を阻害することを例証する。全細胞溶解物中のｐ６５レベルを例証する。
【図３２Ａ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性（Ｃ１４／Ｃ１７）かつＤＭＦ非感受性（Ｃ３２２）のシステイン残基に関する代表的なＭＳ１プロフィールを例示する。
【図３２Ｂ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ヒトとマウスのＰＫＣθ、ヒトＰＫＣδ、およびヒトＰＫＣε（出てくる順にそれぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯＳ　８６５－８６８）の配列保存解析を例証する。赤で示されているのはＣ１４とＣ１７である。
【図３２Ｃ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＰＫＣθ（ＰＤＢ受入番号２ＥＮＪ）のＣ２ドメイン中のＤＭＦ感受性Ｃ１４とＣ１７残基の位置を例示する。
【図３２Ｄ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＭＭＦではなくＤＭＦによる処理がＰＫＣθのＣＤ２８との会合を遮断することを例証する。Ｃ５７ＢＬ／６マウスからの末梢ＣＤ４＋Ｔ細胞を、ＤＭＳＯ、ＤＭＦ（５０μＭ）、あるいはＭＭＦ（５０オＭ）であらかじめインキュベートし、未処理のままであるか、あるいは５分間に抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８で刺激され、その後、洗浄して、溶解させた。免疫沈降（ＩＰ）を、抗ＣＤ２８または対照ＩｇＧ抗体を用いて細胞溶解物中で行い、ＣＤ２８またはＰＫＣθについてＩＰをブロットした。図３２Ｅ－図３２Ｇに関して、ＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞培養物を、空のベクター、ＷＴ　ＰＫＣθ、あるいは２ＣＳ　ＰＫＣθ突然変異体を用いるレトロウイルスの形質導入の前に、２４時間にわたってプレートコーティングした抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８であらかじめ活性化させた。細胞を４８ｈ間刺激のない培地で休ませ、その後、夜通し（図３２Ｆ）、４８時間（図３２Ｇ）、１μｇ／ｍＬのプレートコーティングした抗ＣＤ３（＋２８）を用いて、または用いずに、あるいは、ＩＰの前に溶解可能な１０μｇ／ｍＬの抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８を５分間用いて（図３２Ｄ）、刺激した。図３２Ｄと図３２Ｅについては、データは３回の生物学的複製に代表的な１回の実験からのものである。
【図３２Ｅ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＣＤ２８を用いる、ＷＴ　ＰＫＣθと、Ｃ１４Ｓ／Ｃ１７Ｓ（２ＣＳ）ＰＫＣθ突然変異体の免疫共沈降を例示する。ＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞は、空のベクター（ＥＶ）、ＷＴ　ＰＫＣθ、あるいは２ＣＳ　ＰＫＣθ突然変異体で再構成された。図３２Ｅ－図３２Ｇに関して、ＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞培養物を、空のベクター、ＷＴ　ＰＫＣθ、あるいは２ＣＳ　ＰＫＣθ突然変異体を用いるレトロウイルスの形質導入の前に、２４時間にわたってプレートコーティングした抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８であらかじめ活性化させた。細胞を４８ｈ間刺激のない培地で休ませ、その後、夜通し（図３２Ｆ）、４８時間（図３２Ｇ）、１μｇ／ｍＬのプレートコーティングした抗ＣＤ３（＋２８）を用いて、または用いずに、あるいは、ＩＰの前に溶解可能な１０μｇ／ｍＬの抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８を５分間用いて（図３２Ｄ）、刺激した。図３２Ｄと図３２Ｅについては、データは３回の生物学的複製に代表的な１回の実験からのものである。
【図３２Ｆ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＷＴあるいは２ＣＳのＰＫＣθで再構成されたＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞が、ＣＤ２５発現（図３２Ｆ）とＩＬ－２（図３２Ｇ）を測定することにより、活性化電位について分析されたことを例示する。図３２Ｅ－図３２Ｇに関して、ＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞培養物を、空のベクター、ＷＴ　ＰＫＣθ、あるい

は２ＣＳ　ＰＫＣθ突然変異体を用いるレトロウイルスの形質導入の前に、２４時間にわたってプレートコーティングした抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８であらかじめ活性化させた。細胞を４８ｈ間刺激のない培地で休ませ、その後、夜通し（図３２Ｆ）、４８時間（図３２Ｇ）、１μｇ／ｍＬのプレートコーティングした抗ＣＤ３（＋２８）を用いて、または用いずに、あるいは、ＩＰの前に溶解可能な１０μｇ／ｍＬの抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８を５分間用いて（図３２Ｄ）、刺激した。図３２Ｆと図３２Ｇについては、データは３回の生物学の複製に関する平均±ＳＥを表す。ＷＴ　ＰＫＣθ群と比較して、＊＊＊ｐ＜０．００１
.
【図３２Ｇ】ＰＫＣθ中のＤＭＦ感受性Ｃ１４／Ｃ１７残基がＣＤ２８相互作用とＴ細胞活性化にとって重要であることを例証する。ＷＴあるいは２ＣＳのＰＫＣθで再構成されたＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞が、ＣＤ２５発現（図３２Ｆ）とＩＬ－２（図３２Ｇ）を測定することにより、活性化電位について分析されたことを例示する。図３２Ｅ－図３２Ｇに関して、ＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞培養物を、空のベクター、ＷＴ　ＰＫＣθ、あるいは２ＣＳ　ＰＫＣθ突然変異体を用いるレトロウイルスの形質導入の前に、２４時間にわたってプレートコーティングした抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８であらかじめ活性化させた。細胞を４８ｈ間刺激のない培地で休ませ、その後、夜通し（図３２Ｆ）、４８時間（図３２Ｇ）、１μｇ／ｍＬのプレートコーティングした抗ＣＤ３（＋２８）を用いて、または用いずに、あるいは、ＩＰの前に溶解可能な１０μｇ／ｍＬの抗ＣＤ３＋抗ＣＤ２８を５分間用いて（図３２Ｄ）、刺激した。図３２Ｆと図３２Ｇについては、データは３回の生物学の複製に関する平均±ＳＥを表す。ＷＴ　ＰＫＣθ群と比較して、＊＊＊ｐ＜０．００１
.
【図３３Ａ】ＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性を例証する。マウスのＰＫＣθのＣ１４／Ｃ１７の代表的なＭＳ１プロフィールが、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験中のＤＭＦ（５０μＭ、４時間）に対する感受性を示すことを例示する。
【図３３Ｂ】ＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性を例証する。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験によって判定されるように、それぞれヒトＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性の時間依存および濃度依存を例証する。
【図３３Ｃ】ＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性を例証する。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験によって判定されるように、それぞれヒトＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性の時間依存および濃度依存を例証する。
【図３３Ｄ】ＰＫＣθ中のＣ１４／Ｃ１７のＤＭＦ感受性を例証する。ヒトＰＫＣθのＣ１４／Ｃ１７がＭＭＦ処理（５０μＭ　ＭＭＦ、４時間）に対して非感受性であることを例証する。
【図３４】Ａ－Ｂは、ＡＤＡの中のＤＭＦ感受性システイン残基を例証する。Ａは、ＤＭＦ感受性システイン、Ｃ７５（マゼンタ）がＡＤＡ活性部位（オレンジ）から～２５オングストロームであることを例証する。Ｂは、Ｃ７５に隣接する両方の残基（Ｇ７４とＲ７６（青）中の突然変異が、ＡＤＡＳＣＩＤ（ＯＭＩＭ：６０８９５８）として知られる重症複合免疫不全症に関連付けられていることを例示する。ＰＤＢ受入番号：３ＩＡＲ。
【発明を実施するための形態】
【００８４】
　システイン含有タンパク質は、有糸分裂誘発、増殖、アポトーシス、遺伝子制御、およびタンパク質分解などの多数の細胞機能に関与するタンパク質の大きなレパートリーを包含する。これらのタンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは細胞骨格関連タンパク質を含んでいる。システイン含有タンパク質の調節不全の発現は、多くの場合、炎症関連疾患、神経変性疾患、あるいは癌などの疾患に関連付けられるか、あるいはこれらを調節する。そのため、システイン含有タンパク質に対する潜在的なアゴニスト／アンタゴニストの同定は、患者の疾患状態を改善する助けとなる。
【００８５】

いくつかの例では、構造上複雑な化合物のせいで、および、構造上複雑な化合物の一部がタンパク質と相互に作用することができないことから、薬物スクリーニングには潜在的な制約が存在する。そのため、いくつかの例では、小分子断片は、当初の相互作用を高親和性薬物に構造誘導的に同化させるための拠点として役立つように採用される。いくつかの例では、システイン含有タンパク質と相互に作用する小分子断片を同定する１つの方法は、インビトロ環境下でその相互作用をモニタリングすることを介する。しかしながら、場合によっては、インビトロ環境は、システイン含有タンパク質の未変性状態を模倣しない。他の場合では、インビトロ環境は、小分子断片との相互作用を促すための追加のヘルパータンパク質を欠いている。またさらなるいくつかの例では、システイン含有タンパク質の発現および／または精製の段階中に数々の困難が生じる。

【００８６】

システイン含有タンパク質との相互作用のための小分子断片を同定する別の方法が本明細書に記載されている。いくつかの例では、この方法は、未変性状態下でシステイン含有タンパク質との相互作用のための小分子断片をマッピングすることを可能にし、それにより、潜在的な小分子断片との相互作用の正確なマッピングを可能にする。いくつかの例では、この方法は、組み換えの発現と精製の必要をなくすことから、新規なシステイン含有タンパク質標的の同定も可能にする。

【００８７】

いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質との相互作用のための小分子断片を同定する方法に関連する、組成物、細胞、細胞集団、アッセイ、プローブ、およびサービスも本明細書に記載されている。

【００８８】

一般的な方法

【００８９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法は、システイン含有タンパク質との競合的な相互作用のための小分子断片とシステイン反応性プローブを利用する。いくつかの実施形態において、方法は図１のＡに記載される通りである。図１のＡは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第１の細胞溶液を接触させる工程を例示する。いくつかの実施形態において、長時間は約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分以上である。いくつかの例では、小分子断片は、タンパク質標的との相互作用のために第１のシステイン反応性プローブと競合する。いくつかの例では、小分子断片あるいはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のシステイン残基とのマイケル反応によって共有結合を形成する。図１Ａは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために、第２のシステイン反応性プローブに第２の細胞溶液を接触させる工程をさらに例示する。いくつかの例では、第１のシステイン反応性プローブと第２のシステイン反応性プローブは同じである。

【００９０】

いくつかの実施形態において、第２の細胞溶液からの細胞は富化培地（例えば、同位体富化培地）で育てられる。いくつかの例では、第１の細胞溶液からの細胞は富化培地（例えば同位体富化培地）で育てられる。いくつかの例では、第１の細胞溶液と第２の細胞溶液の両方からの細胞は、第１の細胞溶液で育てられた細胞から得られたタンパク質が、第２の細胞溶液で育てられた細胞から得られたタンパク質から区別できるように、２つの異なる富化培地（例えば、２つの異なる同位体富化培地）で育てられる。他の実施形態では、細胞溶液の１つのみ（例えば、第１の細胞溶液あるいは第２の細胞溶液のいずれか）からの細胞が富化培地（例えば、同位体富化培地）で育てられる。このような場合、富化された細胞（例えば、同位体富化細胞）から得られたタンパク質は、富化（例えば、同位体富化）されていない細胞から得られたタンパク質から区別できる。

【００９１】

図１のＡで例示されるように、いくつかの例では、第２の細胞溶液は小分子断片で処理されない。そのような場合、第２の細胞溶液は対照として作用する。

【００９２】

いくつかの例では、第２の細胞溶液からの細胞はさらに緩衝液で処理される。場合によっては、緩衝液はＤＭＳＯである。場合によっては、第２の細胞溶液からの細胞は小分子断片で処理されず、第２の細胞溶液は対照として作用する。

【００９３】

いくつかの例では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群とシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群は別々に収集され、組み合わされることでシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを生成し、これはプロテオミクス解析手段によってさらに処理される。場合によっては、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群あるいはシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群のいずれかは、富化培地（例えば同位体富化培地）で育てられた細胞から得られた標識されたタンパク質を含む。場合によっては、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の両方の群は、２つの異なる富化培地（例えば２つの異なる同位体富化培地）で育てられた細胞から得られた標識されたタンパク質を含んでいる。他の場合では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群、あるいはシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の両方の群は、細胞から収集した後にタンパク質が標識された標識タンパク質を含んでいる。

【００９４】

いくつかの例では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群とシステイン反応性プローブタンパク質複合体の第２の群は別々に収集され、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の２つの群の１つからのタンパク質はその後、（例えばメチル化によって）標識される。場合によっては、その後、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群とシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群はその後、組み合わせられ、プロテオミクス解析手段にさらされる。

【００９５】

他の例では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群とシステイン反応性プローブタンパク質複合体の第２の群は別々に収集され、両方の群がプロテオミクス解析手段にさらされる。場合によっては、プロテオミクス解析手段から得られたデータをその後、詳しい解析のために組み合わせる。

【００９６】

いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む。いくつかの例において、質量分析方法は液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）方法である。いくつかの例では、プロテオミクス解析手段はタンパク質同定用のアルゴリズムによって質量分析方法からの結果を解析する工程をさらに含む。いくつかの例では、アルゴリズムは、タンパク質同定用のタンパク質配列データベースと、質量分析方法からの結果を組み合わせる。いくつかの例では、アルゴリズムはＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム、Ｐｒｏｂｉｔｙ、Ｓｃａｆｆｏｌｄ、ＳＥＱＵＥＳＴ、あるいは、Ｍａｓｃｏｔを含む。いくつかの例では、質量分析方法はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦベースの方法である。

【００９７】

いくつかの実施形態において、プロテオミクス解析の後に、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体からのシステイン結合タンパク質の各々に値が割り当てられ、この値はプロテオミクス解析から決定される。いくつかの例では、システイン含有タンパク質の各々に割り当てられた値は、質量分析解析から得られる。いくつかの例では、値は、質量電荷比に応じた信号強度のプロットからの曲線下面積である。いくつかの実施形態において、第１の値が、第１の細胞溶液のシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群からのシステイン結合タンパク質に割り当てられ、第２の値が第２の細胞溶液のシステイン反応性プローブタンパク質複合体の第２の群からの同じシステイン結合タンパク質に割り当てられる。いくつかの例では、その後、２つの値、すなわち、第１の値と第２の

値の間の比率が計算され、同じシステイン結合タンパク質に割り当てられる。いくつかの例では、２を超える比率は、システイン結合タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す。いくつかの例では、比率は２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、あるいは１０を超える。場合によっては、比率はせいぜい２０である。いくつかの例では、同じ小分子断片はシステイン反応性プローブの存在下で多くのシステイン結合タンパク質と相互に作用する。いくつかの例では、小分子は、そのシステイン結合タンパク質パートナーとのシステイン反応性プローブの相互作用を調節する。いくつかの例では、システイン反応性プローブの存在下でのその相互作用タンパク質パートナーを含む小分子断片に関する比率のスペクトルは、タンパク質への小分子断片の特異性を示す。いくつかの例では、比率のスペクトルは、小分子断片がタンパク質への特異的阻害剤、あるいはパン阻害剤（ｐａｎ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）であるかどうかを示す。

【００９８】

いくつかの実施形態において、上記方法によって同定されたシステイン含有タンパク質は、生物学的に活性なシステイン残基を含む。いくつかの例では、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。いくつかの例では、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。いくつかの例では、生物学的に活性なシステイン部位は活性部位システインである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基である。いくつかの例では、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて離れて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。いくつかの例では、生物学的に活性なシステイン部位は非活性部位システインである。

【００９９】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステインと共有結合的に相互作用する小分子断片は、システイン含有タンパク質の活性を損ない、および／または阻害する。いくつかの例では、システイン含有タンパク質は活性型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質の活性型と相互に作用する。いくつかの例では、システイン含有タンパク質はプロアクティブ型で存在する。いくつかの実施形態において、小分子断片および／またはシステイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のプロアクティブ型と相互に作用する。

【０１００】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性なシステイン残基の構造的な環境は、システイン残基の反応性を調節する。いくつかの実施形態において、構造的な環境は疎水性の環境あるいは親水性の環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は帯電環境である。いくつかの実施形態において、構造的な環境は求核環境である。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である。いくつかの例では、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、転写関連タンパク質、あるいは、翻訳関連タンパク質である。いくつかの実施形態において、システイン含有タンパク質は、表１、２、３、８、あるいは９において例示されるタンパク質である。いくつかの例では、表１、２、３、８、あるいは９で例示されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、表１、２、３、８、あるいは９の（＊）によって表示される。

【０１０２】

いくつかの例では、システイン反応性プローブのセットが細胞溶液に加えられる。例え

ば、システイン反応性プローブの第１のセットが第１の細胞溶液に加えられ、システイン反応性プローブの第２のセットが第２の細胞溶液に加えられる。場合によっては、各システイン反応性プローブはセット内で異なる。いくつかの例では、システイン反応性プローブの第１のセットはシステイン反応性プローブの第２のセットと同じである。いくつかの例では、システイン反応性プローブの第１のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第３の群を生成し、システイン反応性プローブの第２のセットは、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第４の群を生成する。いくつかの例では、システイン反応性プローブのセットは、システイン含有タンパク質の同定をさらに促す。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、サンプルは細胞サンプルである。他の例では、サンプルは組織サンプルである。

【０１０４】

いくつかの例では、方法はインサイツ法である。

【０１０５】

小分子断片

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された小分子断片は非天然分子を含む。いくつかの例では、非天然分子は、天然および／または非天然のペプチド断片、あるいは哺乳動物の身体で自然に生成される小分子を含まない。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、約１００ダルトン以上の分子量を含む。いくつかの実施形態において、小分子断片は、約１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン以上の分子量を含む。いくつかの例では、小分子断片の分子量は、約１５０～約５００、約１５０～約４５０、約１５０～約４４０、約１５０～約４３０、約１５０～約４００、約１５０～約３５０、約１５０～約３００、約１５０～約２５０、約１７０～約５００、約１８０～約４５０、約１９０～約４００、約２００～約３５０、約１３０～約３００、あるいは約１２０～約２５０ダルトンの間である。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、遷移金属、あるいはその組み合わせから選択される１つ以上の要素を用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片の分子量は、ハロゲンを用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片の分子量は、非金属を用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片の分子量は、遷移金属を用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は炭素と水素の原子に基づいて計算され、随意にさらに窒素、酸素、および／または硫黄の原子に基づいて計算される。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。場合によっては、小分子断片の分子量はハロゲンの分子量を含まない。小分子断片の分子量は、遷移金属の分子量を含まない。

【０１０９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、マイクロモルまたはミリモルの結合親和性を含む。いくつかの例では、小分子断片は、約１μＭ、１０μＭ、１００μＭ、５００μＭ、１ｍＭ、１０ｍＭ、あるいはそれ以上の結合親和性を含む。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、高リガンド効率（

ＬＥ）を有する。リガンド効率は、その結合パートナーに対するリガンドの１つの原子当たりの結合エネルギーの測定値である。いくつかの例では、リガンド効率は、化合物（Ｎ）の非水素原子の数に対するギブス自由エネルギー（ΔＧ）の比率として定義される：ＬＥ（ΔＧ）＝／Ｎ。

【０１１１】

場合によっては、ＬＥは以下のようにも整えられる：ＬＥ＝１．４（－ｌｏｇＩＣ$_{50}$）／Ｎ。

【０１１２】

いくつかの例では、ＬＥスコアは、約０．３ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、約０．３５ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、約０．４ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、あるいはそれ以上である。

【０１１３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、３の法則（ｔｈｅ　Ｒｕｌｅ　ｏｆ　３）に基づいて設計されている。いくつかの実施形態において、３の法則は、約３以下の無極性溶媒－極性溶媒（例えば、オクタノール－水）分配係数対数Ｐ、約３００ダルトン以下の分子量、約３以下の水素結合供与体、約３以下の水素結合受容体、および約３以下の回転可能な結合を含む。

【０１１４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、３以下の環状環を含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、約２０以上のアミノ酸残基長さであるポリペプチドのシステイン残基に結合する。いくつかの例では、本明細書に記載される小分子断片は、約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００の、７００、８００、９００、１０００以上のアミノ酸残基長さであるポリペプチドのシステイン残基に結合する。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、小分子断片をそれ以上最適化することなく投与される治療薬としては不適切な薬物動態パラメータをさらに含む。いくつかの例では、治療薬として適切な薬物動態パラメータは、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）のガイドラインに沿った、あるいは米国外の同等の食品医薬品局のガイドラインに沿ったパラメータを含む。いくつかの例では、薬物動態パラメータは、ピーク血漿濃度（Ｃｍａｘ）、治療薬（Ｃｍｉｎ）の最低濃度、分布容積、Ｃｍａｘ到達時間、排出半減期、クリアランス、および寿命を含む。いくつかの実施形態において、小分子断片の薬物動態パラメータは、ＦＤＡのガイドラインによって、あるいは米国外の同等の食品医薬品局のガイドラインによって設定されたパラメータの外にある。いくつかの例では、当業者は、本明細書に記載される小分子断片の薬物動態パラメータを考慮すれば、これらの小分子断片がそれ以上の最適化を伴わない治療薬としては不適切であるということを理解する。

【０１１７】

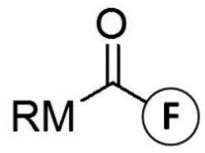
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、システイン含有タンパク質のシステイン残基のチオール基との共有結合的な相互作用を形成する反応性部分と、親和性ハンドル部分とを含む。

【０１１８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される小分子断片は、式（Ｉ）の小分子断片であり、

【０１１９】

【化４５】



式（Ｉ）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、Ｆは小分子断片部分である。

【０１２０】

いくつかの例では、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの例では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。いくつかの例では、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ Ｐｌａｔｆｏｒｍ Ｆｒａｇｍｅｎｔベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ （ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＯＴＡＶＡ断片ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は第２の結合部位を含んでいない。いくつかの例では、小分子断片部分はタンパク質に結合しない。場合によっては、小分子断片部分はタンパク質に共有結合しない。いくつかの例では、小分子断片部分は、タンパク質上の第２の結合部位と相互に作用しない。いくつかの例では、第２の結合部位はＡＴＰ結合部位などの活性部位である。場合によっては、活性部位は、生物学的に活性なシステイン残基から少なくとも約１０、１５、２０、２５、３５、４０Åあるいはそれ以上離れている。いくつかの例では、小分子断片部分はＡＴＰ結合部位などの活性部位とは相互に作用しない。

【０１２２】

いくつかの例では、Ｆは図３において例示される小分子断片部分である。場合によっては、Ｆはカルボニル部分にＦを結合させるリンカー部分をさらに含む。場合によっては、小分子断片は図３において例示される小分子断片である。

【０１２３】

いくつかの例では、Ｆは、以下から選択される小分子断片部分である：Ｎ－（４－ブロモフェニル）－Ｎ－フェニルアクリルアミド、Ｎ－（１－ベンゾイルピペリジン－４－イル）－２－クロロ－Ｎ－フェニルアセトアミド、１－（４－ベンジルピペリジン－１－イル）－２－クロロエタン－１－オン、Ｎ－（２－（１Ｈ－インドール－３－イル）エチル）－２－クロルアセトアミド、Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）アクリルアミド、Ｎ－（４－フェノキシ－３－（トリフルオロメチル）フェニル）－Ｎ－（ピリジン－３－イルメチル）アクリルアミド、Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）アセトアミド、２－クロロ－１－（４－（ヒドロキシジフェニルメチル）ピペリジン－１－イル）エタン－１－オン、（Ｅ）－３－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－２－シアノアクリルアミド、Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－２－ブロモプロパンアミド、Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル

）フェニル）－２－クロロプロパンアミド、Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－Ｎ－（ピリジン－３－イルメチル）－アクリルアミド、３－（２－クロロアセトアミド）－５－（トリフルオロメチル）安息香酸、１－（４－（５－フルオロベンズイソオキサゾール－３－イル）ピペリジン－１－イル）プロプ－２－エン－１－オン、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アクリルアミド－２，６－ジフルオロフェニル）ピペラジン－１－カルボキシラート、Ｎ－（４－ブロモ－２，５－ジメチルフェニル）アクリルアミド、２－クロロアセトアミド－２－デオキシ－α／β－Ｄ－グルコピラノース、２－クロロ－１－（２－メチル－３，４－ジヒドロキノリン－１（２Ｈ）－イル）エタン－１－オン、Ｎ－シクロヘキシル－Ｎ－フェニルアクリルアミド、１－（５－ブロモインドリン－１－イル）プロプ－２－エン－１－オン、Ｎ－（１－ベンジルピペリジン－４－イル）－Ｎ－フェニルアクリルアミド、２－クロロ－Ｎ－（２－メチル－５－（トリフルオロメチル）フェニル）アセトアミド、１－（５－ブロモインドリン－１－イル）－２－クロロエタン－１－オン、２－クロロ－Ｎ－（キノリン－５－イル）アセトアミド、１－（４－ベンジルピペリジン－１－イル）プロプ－２－エン－１－オン、２－クロロ－Ｎ－（（３－ヒドロキシ－５－（ヒドロキシメチル）－２－メチルピリジン－４－イル）メチル）アセトアミド、あるいは１－（６，７－ジメトキシ－３，４－ジヒドロイソキノリン－２（１Ｈ）－イル）プロプ－２－エン－１－オン。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は、約１００、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン以上の分子量を含む。いくつかの例では、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、約１５０～約５００、約１５０～約４５０、約１５０～約４４０、約１５０～約４３０、約１５０～約４００、約１５０～約３５０、約１５０～約３００、約１５０～約２５０、約１７０～約５００、約１８０～約４５０、約１９０～約４００、約２００～約３５０、約１３０～約３００、あるいは約１２０～約２５０ダルトンの間である。

【０１２５】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、遷移金属、あるいはその組み合わせから選択される１つ以上の要素を用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、ハロゲンを用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、非金属を用いる富化の前の分子量である。いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、遷移金属を用いる富化の前の分子量である。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属、あるいはその組み合わせの分子量を含まない。場合によっては、式（Ｉ）の小分子断片の分子量はハロゲンの分子量を含まない。場合によっては、式（Ｉ）の小分子断片の分子量は遷移金属の分子量を含まない。

【０１２７】

いくつかの例では、式（Ｉ）の小分子断片はマイクロモルまたはミリモルの結合親和性を含む。いくつかの例では、式（Ｉ）の小分子断片は、約１μＭ、１０μＭ、１００μＭ、５００μＭ、１ｍＭ、１０ｍＭ、あるいはそれ以上の結合親和性を含む。

【０１２８】

場合によっては、式（Ｉ）の小分子断片は、約０．３ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、約０．３５ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、約０．４ｋｃａｌ　ｍｏｌ$^{-1}$ＨＡ$^{-1}$、あるいはそれ以上のＬＥスコアを有する。

【０１２９】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は、３の法則の設計パラメータに続く。いくつかの例では、式（Ｉ）の小分子断片は、約３以下の無極性溶媒－極性溶媒（例えば、オクタノール－水）分配係数対数Ｐ、約３００ダルトン以下の分子量、約３以下の水素結合供与体、約３以下の水素結合受容体、および約３以下の回転可能な結合を有する。

【０１３０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される式（Ｉ）の小分子断片は、３以下の環状環を含む。

【０１３１】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）の小分子断片は、約２０以上のアミノ酸残基長さであるポリペプチドのシステイン残基（例えばシステイン含有タンパク質）に結合する。いくつかの例では、本明細書に記載される小分子断片は、約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００以上のアミノ酸残基長さであるポリペプチドのシステイン残基に結合する。

【０１３２】

いくつかの例では、式（Ｉ）の小分子断片は、ＦＤＡのガイドラインによって、あるいは米国外の同等の食品医薬品局によって設定されたパラメータの外にある薬物動態パラメータを有する。いくつかの例では、当業者は、本明細書に記載される式（Ｉ）の小分子断片の薬物動態パラメータを考慮すれば、これらの小分子断片がそれ以上の最適化を伴わない治療薬としては不適切であるということを理解する。

【０１３３】

いくつかの実施形態において、小分子断片は特異的阻害剤あるいはｐａｎ阻害剤である。

【０１３４】

システイン反応性プローブ

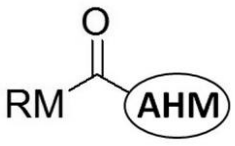
いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは、システイン含有タンパク質のシステイン残基のチオール基との共有結合的な相互作用を形成する反応性部分と、親和性ハンドル部分とを含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態において、システイン反応性プローブは式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり、

【０１３６】

【化４６】



式（ＩＩ）

式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。

【０１３７】

いくつかの例では、マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む。いくつかの例では、親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む。いくつかの例では、結合部分は化合物ライブラリーから得られる小分子断片である。いくつかの例では、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ　Ｆｒａｇｍｅｎｔベースの創薬、Ｍａｙｂｒｉｄｇ

e断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸのＴＣＩ－Ｆｒａｇ、ＡＳＩＮＥＸのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ ＢｉｏのＦｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ （ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｌｉｂｒａｒｙ、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、Ｌｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＯＴＡＶＡ断片ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ ＬａｖｏｒａｔｏｒｙのＡｌｌｉｕｍ、あるいはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型の親和性ハンドルである。いくつかの実施形態において、親和性ハンドルは生体直交型のケミストリーを利用する。本明細書で使用されるように、生体直交型のケミストリーは、天然の生化学的プロセスに干渉することなく、生物系（例えば、細胞）の内部で生じるあらゆる化学反応を指す。

【０１３９】

場合によっては、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネートの基を含む。場合によっては、親和性ハンドルはアルキンあるいはアジド基を含む。

【０１４０】

幾つかの事例では、親和性ハンドルはアルキン基である。親和性ハンドルに関連して使用されるような用語「アルキン基」は、Ｈ－Ｃ≡Ｃ－Ｒ、HC_2R、$R_1-C\equiv CR_2$、または$R_1C_2R_2$の化学式を有する基を指す。本化学式に関連して、Ｒ、R_1、およびR_2は、独立して、本明細書に記載されるシステイン反応性プローブ部分、リンカー、またはその組み合わせである。幾つかの場合では、アルキン基は、アジドを含有している分子との化学反応に共有結合的に関連づけられることが可能である。幾つかの事例では、親和性ハンドルはアジド基である。

【０１４１】

幾つかの事例では、親和性ハンドル（例えばアルキン基またはアジド基）は、非天然および非変動の（ｎｏｎ－ｐｅｒｔｕｒｂｅｄ）生体直交型の化学的ハンドルとして機能する。幾つかの事例では、親和性ハンドル（例えばアルキン基またはアジド基）は、クリックケミストリーなどの化学反応によってさらに誘導体化される。幾つかの事例では、クリックケミストリーは、１，２，３－トリアゾールにつながるアルキンおよびアジドの銅（Ｉ）触媒性の［３＋２］－ヒュスゲン１，３双極性の環化付加である。他の事例では、クリックケミストリーは、上記の反応の銅を含まない変異体（ｃｏｐｐｅｒ ｆｒｅｅ ｖａｒｉａｎｔ）である。

【０１４２】

幾つかの事例では、親和性ハンドルは、リンカーをさらに含む。幾つかの事例では、リンカーは、親和性ハンドルを反応性部分に架橋する。

【０１４３】

幾つかの事例では、親和性ハンドルは、親和性リガンドにさらに結合される。幾つかの場合では、親和性リガンドは、発色団、標識基、またはそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、発色団は、蛍光色素、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレート、または蛍光酵素基質を含む。幾つかの場合では、発色団は、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレート、または蛍光酵素基質を含む。他の場合では、発色団はフルオロフォアを含む。

【０１４４】

幾つかの実施形態では、フルオロフォアは、ローダミン、ロドール、フルオレセイン、チオフルオレセイン、アミノフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン、クロロフルオレセイン、メチルフルオレセイン、スルホフルオレセイン、アミノロドール、カルボキシロドール、クロロロドール、メチルロドール、スルホロドール、アミノローダミン、カルボキシローダミン、クロローダミン、メチルローダミン、スルホローダミン、チオローダミン、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニン、シアニン２、シアニン３、シアニン３．５、シアニン５、シアニン５．５、シアニン７、オキサジアゾール誘導体、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾール、ピレン誘導体、カスケードブルー、オキサジン誘導体、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０、アクリジン誘導体、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アリールメチン誘導体、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、テトラピロール誘導体、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビン１－ジメチアルアミノナフチル－５－スルホン酸塩、１－アニリノ－８－ナフタレンスルホン酸塩、２－ｐ－トウイジニル－６－ナフタレンスルホン酸塩、３－フェニル－７－イソシアナトクマリン、Ｎ－（ｐ－（２－ベンゾオキサゾリル）フェニル）マレイミド、スチルベン、ピレン、６－ＦＡＭ（フルオレセイン）、６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）、５（６）－ＦＡＭ、５－ＦＡＭ、フルオレセインｄＴ、５－ＴＡＭＲＡ－カダベリン、２－アミノアクリドン、ＨＥＸ、ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）、ＭＡＸ、ＴＥＴ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＡＲＭＡ（商標）（ＮＨＳエステル）、ＴＥＸ６１５、ＡＴＴＯ（商標）４８８、ＡＴＴＯ（商標）５３２、ＡＴＴＯ（商標）５５０、ＡＴＴＯ（商標）５６５、ＡＴＴＯ（商標）ＲｈｏｌＯｌ、ＡＴＴＯ（商標）５９０、ＡＴＴＯ（商標）６３３、ＡＴＴＯ（商標）６４７Ｎ、ＴＹＥ（商標）５６３、ＴＹＥ（商標）６６５、またはＴＹＥ（商標）７０５を含む。

【０１４５】

幾つかの実施形態では、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、またはそれらの組み合わせである。本明細書で使用されるように、本明細書に記載されるビオチン部分は、ビオチンおよびビオチン誘導体を含む。典型的なビオチン誘導体は、限定されないが、デスチオビオチン、ビオチンアルキンまたはビオチンアジドを含む。幾つかの事例では、本明細書に記載されるビオチン部分は、デスチオビオチンである。幾つかの場合では、本明細書に記載されるビオチン部分は、ｄ－デスチオビオチンである。

【０１４６】

幾つかの事例では、標識基はビオチン部分である。幾つかの事例では、ビオチン部分は、長さが５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５またはそれ以上の残基などのリンカーをさらに含む。幾つかの事例では、リンカーは、プロテアーゼ切断部位などの切断部位をさらに含む。幾つかの場合では、ビオチン部分は、ストレプトアビジン部分と相互作用する。幾つかの事例では、ビオチン部分はさらに、ストレプトアビジン結合ビーズなどのビーズに付けられる。幾つかの事例では、ビオチン部分はさらに、ストレプトアビジン結合樹脂またはストレプトアビジン結合固体支持体などの、樹脂または固体支持体に付けられる。幾つかの事例では、固体支持体は、プレート、プラットフォーム、カバースライド、マイクロ流体チャネルなどである。

【０１４７】

幾つかの実施形態では、親和性ハンドル部分はさらに発色団を含む。

【０１４８】

幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブは、図３に例示されるシステイン反応性プローブである。幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブは、次のものから選択されるシステイン反応性プローブである：Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－２－ヨードアセトアミド、ヨードアセトアミド－ローダミン、３－アクリルアミド－Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－５－（トリフルオロメチル）ベンズアミド、３－アクリルアミド－Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－５－（トリフルオロメチル）ベンズ

アミド、または２－クロロ－Ｎ－（１－（３－エチニルベンゾイル）ピペリジン－４－イル）－Ｎ－フェニルアセトアミド。

【０１４９】

＜システイン含有タンパク質＞

幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、可溶性タンパク質または膜タンパク質である。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、タンパク質輸送、脂質代謝、アポトーシス、転写、電子伝達、ｍＲＮＡプロセシング、または宿主ウイルス相互作用などの生物学的過程の１つ以上に関係している。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、癌などの疾患の１つ以上、あるいは免疫性、代謝性、発達性、生殖の、神経学的な、精神医学的な、腎臓の、心血管の、または血液学的な障害または疾病などの、１つ以上の障害または疾病に関連付けられている。

【０１５０】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、生物学的に活性なシステイン残基を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、１つ以上のシステインを含み、そこで少なくとも１つのシステインは、生物学的に活性なシステイン残基である。幾つかの場合では、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基である。幾つかの場合では、活性部位のリガンドまたは残基に対して約１０Å以下に位置するシステイン残基は、活性部位システインである。他の場合では、生物学的に活性なシステイン部位は、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて位置するシステイン残基である。幾つかの事例では、システイン残基は、活性部位のリガンドまたは残基から１２Å、１５Å、２０Å、２５Å、３０Å、３５Å、４０Å、４５Åを超える、または５０Åを超えて位置する。幾つかの場合では、活性部位のリガンドまたは残基から１０Åを超えて位置するシステイン残基は、非活性部位システインである。さらなる場合では、システイン含有タンパク質は、活性型または活性促進型で存在する。

【０１５１】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連のタンパク質、翻訳関連のタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、または細胞骨格関連のタンパク質の１つ以上の機能を含む。幾つかの実施形態の、システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連のタンパク質、翻訳関連のタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、または細胞骨格関連のタンパク質である。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、分類されていない機能を有している。

【０１５２】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は酵素である。酵素は、化学反応を加速させるか又は触媒するタンパク質分子である。幾つかの実施形態では、酵素の限定しない例は、キナーゼ、プロテアーゼ、または脱ユビキチン化酵素を含む。

【０１５３】

幾つかの事例では、典型的なキナーゼは、Ｔｅｃ、ブルトン型チロシンキナーゼ（Ｂｔｋ）、インターロイキン－２誘導性のＴ細胞キナーゼ（Ｉｔｋ）、Ｂｍｘ（またはＥｍｔ／Ｔｓｋ）、およびＴｘｋ／Ｒｌｋなどの、キナーゼのＴＥＣファミリー；ＳＹＫおよびゼータ鎖関連のタンパク質キナーゼ７０（ＺＡＰ－７０）などの、ひ臓チロシンキナーゼ（Ｓｙｋ）ファミリー；Ｓｒｃ、Ｙｅｓ、Ｆｙｎ、Ｆｇｒ、Ｌｃｋ、Ｈｃｋ、Ｂｌｋ、Ｌｙｎ、およびＦｒｋなどの、ＳｒｃキナーゼＳ；ヤヌスキナーゼ１（ＪＡＫ１）、ヤヌスキナーゼ２（ＪＡＫ２）、ヤヌスキナーゼ３（ＪＡＫ３）、およびチロシンキナーゼ２（ＴＹＫ２）などの、ＪＡＫキナーゼ；あるいはＨｅｒｌ（ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢｌ）、Ｈｅｒ２（Ｎｅｕ、ＥｒｂＢ２）、Ｈｅｒ３（ＥｒｂＢ３）、およびＨｅｒ４（ＥｒｂＢ４）などの、キナーゼのＥｒｂＢファミリー、などのチロシンキナーゼを含む。

【０１５４】
幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質はプロテアーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼはシステインプロテアーゼである。幾つかの場合では、システインプロテアーゼは、カスパーゼである。幾つかの事例では、カスパーゼはイニシエーター（頂端）カスパーゼである。幾つかの事例では、カスパーゼはエフェクター（実行型）カスパーゼである。典型的なカスパーゼは、ＣＡＳＰ２、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ９、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＣＡＳＰ４、およびＣＡＳＰ５を含む。

【０１５５】
幾つかの事例では、システインプロテアーゼはカテプシンである。典型的なカテプシンは、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＦ、カテプシンＨ、カテプシンＫ、カテプシンＬ１、カテプシンＬ２、カテプシンＯ、カテプシンＳ、カテプシンＷ、またはカテプシンＺを含む。

【０１５６】
幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は脱ユビキチン化酵素（ＤＵＢ）である。幾つかの実施形態では、典型的な脱ユビキチン化酵素は、システインプロテアーゼＤＵＢまたはメタロプロテアーゼを含む。典型的なシステインプロテアーゼＤＵＢは、ＵＳＰ１、ＵＳＰ２、ＵＳＰ３、ＵＳＰ４、ＵＳＰ５、ＵＳＰ６、ＵＳＰ７、ＵＳＰ８、ＵＳＰ９Ｘ、ＵＳＰ９Ｙ、ＵＳＰ１０、ＵＳＰ１１、ＵＳＰ１２、ＵＳＰ１３、ＵＳＰ１４、ＵＳＰ１５、ＵＳＰ１６、ＵＳＰ１７、ＵＳＰ１７Ｌ２、ＵＳＰ１７Ｌ３、ＵＳＰ１７Ｌ４、ＵＳＰ１７Ｌ５、ＵＳＰ１７Ｌ７、ＵＳＰ１７Ｌ８、ＵＳＰ１８、ＵＳＰ１９、ＵＳＰ２０、ＵＳＰ２１、ＵＳＰ２２、ＵＳＰ２３、ＵＳＰ２４、ＵＳＰ２５、ＵＳＰ２６、ＵＳＰ２７Ｘ、ＵＳＰ２８、ＵＳＰ２９、ＵＳＰ３０、ＵＳＰ３１、ＵＳＰ３２、ＵＳＰ３３、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ３５、ＵＳＰ３６、ＵＳＰ３７、ＵＳＰ３８、ＵＳＰ３９、ＵＳＰ４０、ＵＳＰ４１、ＵＳＰ４２、ＵＳＰ４３、ＵＳＰ４４、ＵＳＰ４５、またはＵＳＰ４６などの、ユビキチンに特異的なプロテアーゼ（ＵＳＰ／ＵＢＰ）；ＯＴＵＢ１およびＯＴＵＢ２などの卵巣腫瘍（ＯＴＵ）プロテアーゼ；ＡＴＸＮ３およびＡＴＸＮ３Ｌなどのマチャドージョセフィン（Ｍａｃｈａｄｏ－Ｊｏｓｅｐｈｉｎ）ドメイン（ＭＪＤ）プロテアーゼ；およびＢＡＰ１、ＵＣＨＬ１、ＵＣＨＬ３、およびＵＣＨＬ５などのユビキチンＣ末端ヒドロラーゼ（ＵＣＨ）プロテアーゼを含む。典型的なメタロプロテアーゼは、Ｊａｂｌ／Ｍｏｖ３４／Ｍｐｒ１ Ｐａｄ１ Ｎ末端＋（ＭＰＮ＋）（ＪＡＭＭ）ドメインプロテアーゼを含む。

【０１５７】
幾つかの実施形態では、酵素としての典型的なシステイン含有タンパク質は、限定されないが、グリセルアルデヒドー３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、タンパク質アルギニンＮ－メチルトランスフェラーゼ１（ＰＲＭＴ１）、ペプチジループロリル シスートランスイソメラーゼＮＦＭＡ相互作用（ＰＩＮ１）、アセチルーＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（ミトコンドリア）（ＡＣＡＴ１）、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼＰ（ＧＳＴＰ１）、伸長因子２（ＥＥＦ２）、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼオメガ－１（ＧＳＴＯ１）、アセチルーＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（ミトコンドリア）（ＡＣＡＴ１）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ４（ＰＤＩＡ４）、プロスタグランジンＥシンターゼ３（ＰＴＧＥＳ３）、アデノシンキナーゼ（ＡＤＫ）、伸長因子２（ＥＥＦ２）、酢酸イソアミルを加水分解するエステラーゼ１相同体（ＩＡＨ１）、ペルオキシレドキシン－５（ミトコンドリア）（ＰＲＤＸ５）、イノシン－５－一リン酸デヒドロゲナーゼ２型（ＩＭＰＤＨ２）、３－ヒドロキシアシルーＣｏＡデヒドロゲナーゼ２型（ＨＳＤ１７Ｂ１０）、オメガーアミダーゼＮＩＴ２（ＮＩＴ２）、アルドースレダクターゼ（ＡＫＲＩＢＩ）、単官能性Ｃ１－テトラヒドロ葉酸シンターゼ（ミトコンドリア）（ＭＴＨＦＤＩＬ）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ６（ＰＤＩＡ６）、ピルビン酸キナーゼアイソザイムＭ１／Ｍ２（ＰＫＭ）、６－ホスホグルコノラクトナーゼ（ＰＧＬＳ）、アセチルーＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（ミトコンドリア

）（ＡＣＡＴ１）、ＥＲＯ１様タンパク質アルファ（ＥＲＯ１Ｌ）、チオレドキシンドメイン含有タンパク質１７（ＴＸＮＤＣ１７）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ４（ＰＤＩＡ４）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ３（ＰＤＩＡ３）、３－ケトアシル－ＣｏＡチオラーゼ（ミトコンドリア）（ＡＣＡＡ２）、ダイナミン－２（ＤＮＭ２）、ＤＮＡ複製ライセンス化因子ＭＣＭ３（ＭＣＭ３）、セリン－ｔＲＮＡリガーゼ（細胞質）（ＳＡＲＳ）、脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳＮ）、アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（ミトコンドリア）（ＡＣＡＴ１）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼ（Ｐ４ＨＢ）、デオキシシチジン－キナーゼ（ＤＣＫ）、真核生物翻訳開始因子３サブユニット（ＥＩＦ３Ｆ）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ６（ＰＤＩＡ６）、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン－ペプチドＮ－アセチルグルコサミン（ＯＧＴ）、ケトサミン（Ｋｅｔｏｓａｍｉｎｅ）－３－キナーゼ（ＦＮ３ＫＲＰ）、タンパク質ＤＪ－１（ＰＡＲＫ７）、ホスホグリコール酸ホスファターゼ （ＰＧＰ）、ＤＮＡ複製ライセンス化因子ＭＣＭ６（ＭＣＭ６）、フルクトース２，６－ビスホスファターゼＴＩＧＡＲ（ＴＩＧＡＲ）、切断・ポリアデニル化特異的因子サブユニット（ＣＰＳＦ３）、ユビキチン結合酵素Ｅ２ Ｌ３（ＵＢＥ２Ｌ３）、アラニン－－ｔＲＮＡリガーゼ、細胞質（ＡＡＲＳ）、マンノース－１ －リン酸グアニル酸転移酵素アルファ（ＧＭＰＰＡ）、Ｃ－１－テトラヒドロ葉酸シンターゼ（細胞質）（ＭＴＨＦＤ１）、ダイナミン－１様タンパク質（ＤＮＭ１Ｌ）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ３（ＰＤＩＡ３）、アスパルチルアミノペプチダーゼ（ＤＮＰＥＰ）、アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（細胞質ゾル）（ＡＣＡＴ２）、チオレドキシンドメイン含有タンパク質５（ＴＸＮＤＣ５）、チミジンキナーゼ（細胞質ゾル）（ＴＫ１）、イノシン－５－一リン酸デヒドロゲナーゼ２（ＥＶＩＰＤＨ２）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムＬ３（ＵＣＨＬ３）、インテグリン結合タンパク質キナーゼ（ＩＬＫ）、サイクリン依存性キナーゼ２（ＣＤＫ２）、ヒストンアセチルトランスフェラーゼＢ型触媒サブユニット（ＨＡＴ１）、エノイル－ＣｏＡデルタイソメラーゼ２（ミトコンドリア）（ＥＣＩ２）、Ｃ－１－テトラヒドロ葉酸シンターゼ（細胞質）（ＭＴＨＦＤ１）、デオキシシチジンキナーゼ（ＤＣＫ）、ユビキチン様修飾酵素活性化酵素６（ＵＢＡ６）、タンパク質－Ｌ－イソアスパラギン酸（Ｄ－アスパラギン酸塩）Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（ＰＣＭＴ１）、単官能性Ｃ１－テトラヒドロ葉酸シンターゼ（ミトコンドリア）（ＭＴＨＦＤ１Ｌ）、チミジル酸キナーゼ（ＤＴＹＭＫ）、タンパク質ＥＴＨＥ１（ミトコンドリア）（ＥＴＨＥ１）アルギニン－ｔＲＮＡリガーゼ（細胞質）（ＲＡＲＳ）、ＮＥＤＤ８－活性化酵素Ｅ１触媒サブユニット（ＵＢＡ３）、二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰ２Ｋ３）、ユビキチン結合酵素Ｅ２Ｓ（ＵＢＥ２Ｓ）、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＰＰＡＴ）、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ミトコンドリア）（ＡＬＤＨ５Ａ１）、ＣＡＤ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（ＰＣＫ２）、６－ホスホフルクトキナーゼＣ型（ＰＦＫＰ）、アシル－ＣｏＡシンテターゼファミリーメンバー２（ミトコンドリア）（ＡＣＳＦ２）、多機能タンパク質ＡＤＥ２（ＰＡＩＣＳ）、脱ＳＵＭＯ化イソペプチダーゼ１（ＤＥＳＩ１）、６－ホスホフルクトキナーゼＣ型（ＰＦＫＰ）、Ｖ型プロトンＡＴＰアーゼ触媒サブユニットＡ（ＡＴＰ６Ｖ１Ａ）、３－ケトアシル－ＣｏＡチオラーゼ（ペルオキシソーム）（ＡＣＡＡ１）、ガラクトキナーゼ（ＧＡＬＫ１）、チミジンキナーゼ（細胞質ゾル）（ＴＫ１）、ＡＴＰアーゼＷＲＮＩＰ１（ＷＲＮＩＰ１）、ホスホリボシルホルミルグリシンアミジンシンターゼ（ＰＦＡＳ）、Ｖ型プロトンＡＴＰアーゼ触媒サブユニットＡ（ＡＴＰ６Ｖ１Ａ）、チオレドキシンドメイン含有タンパク質５（ＴＸＮＤＣ５）、４－トリメチルアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ９Ａ１）、二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰ２Ｋ４）、カルシニューリン様ホスホエステラーゼドメイン含有（ＣＰＰＥＤ１）、二重特異性プロテインフォスファターゼ１２（ＤＵＳＰ１２）、ホスホリボシルホルミルグリシンアミジンシンターゼ（ＰＦＡＳ）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（ＭＶＤ）、Ｄ－３－ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ（ＰＨＧＤＨ）、細胞周期チェックポイント制御タンパク質ＲＡＤ９Ａ（ＲＡＤ９Ａ）、ペルオ

キシレドキシン－１（ＰＲＤＸ１）、ソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）、ペルオキシレドキシン－４（ＰＲＤＸ４）、ＡＭＰデアミナーゼ２（ＡＭＰＤ２）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ＩＤＨｌ）、ピルビン酸カルボキシラーゼ（ミトコンドリア）（ＰＣ）、インテグリン結合キナーゼ関連のセリン／トレオニン（ＩＬＫＡＰ）、メチルマロン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ６Ａ１）、２６Ｓプロテアソーム非ＡＴＰアーゼ調節サブユニット１４（ＰＳＭＤ１４）、チミジル酸キナーゼ（ＤＴＹＭＫ）、６－ホスホフルクト－２－キナーゼ／フルクトース－２，６－ビスリン酸（ｂｉｓｐｈｏｓｐｈａｔａ）（ＰＦＫＦＢ２）、ペルオキシレドキシン－５（ミトコンドリア）（ＰＲＤＸ５）、ＰＤＰ１、カテプシンＢ（ＣＴＳＢ）、膜貫通プロテアーゼセリン１２（ＴＭＰＲＳＳ１２）、ＵＤＰ－グルコース６－デヒドロゲナーゼ（ＵＧＤＨ）、ヒスチジントライアドヌクレオチド結合タンパク質１（ＨＩＮＴ１）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＵＢＲ５（ＵＢＲ５）、ＳＡＭドメインおよびＨＤドメイン含有タンパク質１（ＳＡＭＨＤ１）、高可能性ｔＲＮＡトレオニルカルバモイルアデノシン生合成（ＯＳＧＥＰ）、メチル化ＤＮＡ－－タンパク質－システインメチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）、脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳＮ）、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）、サイクリン依存性キナーゼ１９（ＣＤＫ１９）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼ３８（ＳＴＫ３８）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ９（ＭＡＰＫ９）、ｔＲＮＡ（アデニン（５８）－Ｎ（１））－メチルトランスフェラーゼ触媒性（ＴＲＭＴ６１Ａ）、グリオキシル酸レダクターゼ／ヒドロキシピルビン酸レダクターゼ（ＧＲＨＰＲ）、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ミトコンドリア）（ＡＬＤＨ２）、ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼサブユニットベータ（ＰＭＰＣＢ）、３－ケトアシル－ＣｏＡチオラーゼ、ペルオキシゾーム（ＡＣＡＡ１）リゾフォスファチジン酸ホスファターゼ６型（ＡＣＰ６）、ユビキチン／ＩＳＧ１５結合酵素Ｅ２　Ｌ６（ＵＢＥ２Ｌ６）、カスパーゼ－８（ＣＡＳＰ８）、２，５－ホスホジエステラーゼ１２（ＰＤＥ１２）、チオレドキシンドメイン含有タンパク質１２（ＴＸＮＤＣ１２）、ニトリラーゼ相同体１（ＮＩＴ１）、ＥＲＯ１様タンパク質アルファ（ＥＲＯ１Ｌ）、ＳＵＭＯ活性化酵素サブユニット１（ＳＡＥ１）、ロイシン－－ｔＲＮＡリガーゼ（細胞質）（ＬＡＲＳ）、タンパク質－グルタミンガンマ－グルタミルトランスフェラーゼ２（ＴＧＭ２）、高可能性ＤＮＡ　ｄＣ－ｄＵ編集酵素ＡＰＯＢＥＣ－３Ｃ（ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ）、二本鎖ＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ＩＤＨ２）、メチルクロトニル－ＣｏＡカルボキシラーゼベータ鎖（ミトコンドリア）（ＭＣＣＣ２）、ウリジンホスホリラーゼ１（ＵＰＰ１）、グリコーゲンホスホリラーゼ（脳型）（ＰＹＧＢ）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＵＢＲ５（ＵＢＲ５）、プロコラーゲン－リジン，２－オキソグルタラート５－ジオキシゲナーゼ１（ＰＬＯＤ１）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ４８（ＵＳＰ４８）、アコニット酸ヒドラターゼ（ミトコンドリア）（ＡＣ０２）、ＧＭＰレダクターゼ２（ＧＭＰＲ２）、ピロリン－５－カルボン酸塩レダクターゼ１（ミトコンドリア）（ＰＹＣＲ１）、カテプシンＺ（ＣＴＳＺ）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＵＢＲ２（ＵＢＲ２）、システインプロテアーゼＡＴＧ４Ｂ（ＡＴＧ４Ｂ）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼＮｅｋ９（ＮＥＫ９）、リシン特異的デメチラーゼ４Ｂ（ＫＤＭ４Ｂ）、インスリン分解酵素（ＩＤＥ）、ジペプチジルペプチダーゼ９（ＤＰＰ９）、デカプレニル二リン酸シンターゼサブユニット２（ＰＤＳＳ２）、ＴＦＩＩＨ基本転写因子複合体ヘリカーゼ（ＥＲＣＣ３）、メチオニン－Ｒ－スルホキシドレダクターゼＢ２　（ミトコンドリア）（ＭＳＲＢ２）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＢＲＥＩＢ（ＲＮＦ４０）、チミジル酸シンターゼ（ＴＹＭＳ）、サイクリン依存性キナーゼ５（ＣＤＫ５）、二官能性３－フォスフォアデノシン５－ホスホ硫酸（ＰＡＰＳＳ２）、短／分枝鎖特異的アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ（ＡＣＡＤＳＢ）、カテプシンＤ（ＣＴＳＤ）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＨＵＷＥ１（ＨＵＷＥ１）、カルパイン－２触媒サブユニット（ＣＡＰＮ２）、二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰ２Ｋ７）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ・キナーゼ・キナーゼＭＬＴ（ＭＬＴＫ）、ブレオマイシンヒドロラーゼ（ＢＬＭＨ）、高可能性ＡＴＰ依存性

ＲＮＡヘリカーゼＤＤＸ５９（ＤＤＸ５９）、シスタチオニンγリアーゼ（ＣＴＨ）、Ｓ－アデノシルメチオニンシンターゼアイソフォーム２型（ＭＡＴ２Ａ）、６－ホスホフルクトキナーゼＣ型（ＰＦＫＰ）、シチジンデアミナーゼ（ＣＤＡ）、ＤＮＡ指向性ＲＮＡポリメラーゼＩＩサブユニットＲＰＢ２（ＰＯＬＲ２Ｂ）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼ（Ｐ４ＨＢ）、プロコラーゲン－リジン，２－オキソグルタラート５－ジオキシゲナーゼ３（ＰＬＯＤ３）、ヌクレオシド二リン酸結合部分Ｘモチーフ８（ミトコンドリア）（ＮＵＤＴ８）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＨＵＷＥ１（ＨＵＷＥ１）、メチル化ＤＮＡ－－タンパク質－システインメチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）、ニトリラーゼ相同体１（ＮＩＴ１）、インターフェロン調節因子２結合タンパク質１（ＩＲＦ２ＢＰ１）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ１６（ＵＳＰ１６）、グリシルペプチドＮ－テトラデカノイルトランスフェラーゼ２（ＮＭＴ２）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤３（ＣＤＫＮ３）、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ様タンパク質２（ＨＳＤＬ２）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼＶＲＫ１（ＶＲＫ１）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼＡ－Ｒａｆ（ＡＲＡＦ）、ＡＴＰ－クエン酸シンターゼ（ＡＣＬＹ）、高可能性リボヌクレアーゼＺＣ３Ｈ１２Ｄ（ＺＣ３Ｈ１２Ｄ）、末梢原形質膜タンパク質ＣＡＳＫ（ＣＡＳＫ）、ＤＮＡポリメラーゼイプシロンサブユニット３（ＰＯＬＥ３）、アルデヒドデヒドロゲナーゼＸ（ミトコンドリア）（ＡＬＤＨ１Ｂ１）、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼサブユニットＡＬＧ１３（ＡＬＧ１３）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ４（ＰＤＩＡ４）、ＤＮＡポリメラーゼアルファ触媒サブユニット（ＰＯＬＡ１）、エチルマロニル－ＣｏＡデカルボキシラーゼ（ＥＣＨＤＣ１）、タンパク質－チロシンキナーゼ２－ベータ（ＰＴＫ２Ｂ）、Ｅ３ ＳＵＭＯタンパク質リガーゼＲａｎＢＰ２（ＲＡＮＢＰ２）、レグマイン（ＬＧＭＮ）、非特異的脂質輸送タンパク質（ＳＣＰ２）、長鎖脂肪酸－－ＣｏＡリガーゼ４（ＡＣＳＬ４）、二重特異性プロテインフォスファターゼ１２（ＤＵＳＰ１２）、オキシドレダクターゼＨＴＡＴＩＰ２（ＨＴＡＴＩＰ２）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼＭＲＣＫベータ（ＣＤＣ４２ＢＰＢ）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、非特異的脂質輸送タンパク質（ＳＣＰ２）、二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰ２Ｋ７）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ２８（ＵＳＰ２８）、６－ホスホフルクトキナーゼ（肝臓型）（ＰＦＫＬ）、ＳＷＩ／ＳＮＦ関連のマトリックスに会合したアクチン依存性（ＳＭＡＲＣＡＤ１）、プロテインフォスファターゼ メチルエストラーゼ１（ＰＰＭＥ１）、ＤＮＡ複製ライセンス化因子ＭＣＭ５（ＭＣＭ５）、６－ホスホフルクト－２－キナーゼ／フルクトース－２，６－ビスホスファターゼ（ｂｉｓｐｈｏｓｐｈａｔａ）（ＰＦＫＦＢ４）、デヒドロゲナーゼ／レダクターゼＳＤＲファミリーメンバー１１（ＤＨＲＳ１１）、ピログルタミニル－ペプチダーゼ１（ＰＧＰＥＰ１）、高可能性Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼ（ＭＹＣＢＰ２）、ＤＮＡ断片化因子サブユニットベータ（ＤＦＦＢ）、脱ユビキチン化タンパク質ＶＣＩＰ１３５（ＶＣＰＩＰ１）、推定トランスフェラーゼＣＡＦ１７（ミトコンドリア）（ＴＯＡ５７）、カルパイン－７（ＣＡＰＮ７）、ＧＤＰ－Ｌ－フコースシンターゼ（ＴＳＴＡ３）、タンパク質ジスルフィドーイソメラーゼＡ４（ＰＤＩＡ４）、高可能性ＡＴＰ依存性のＲＮＡヘリカーゼ（ＤＤＸ５９）、ＲＮＡエキソヌクレアーゼ４（ＲＥＸ０４）、ＰＤＫ１、Ｅ３ ＳＵＭＯ－タンパク質リガーゼ（ＰＩＡＳ４）、ＤＮＡ（シトシン－５）－メチルトランスフェラーゼ１（ＤＮＭＴ１）、アルファ－アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ７Ａ１）、ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡシンターゼ（細胞質）（ＨＭＧＣＳ１）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼ（ＳＭＵＲＦ２）、アルデヒドデヒドロゲナーゼＸ（ミトコンドリア）（ＡＬＤＨ１Ｂ１）、チロシン－タンパク質キナーゼ（ＢＴＫ）、ＤＮＡ修復タンパク質ＲＡＤ５０（ＲＡＤ５０）
、ＡＴＰ結合ドメイン含有タンパク質４（ＡＴＰＢＤ４）、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ３（ＮＭＥ３）、インターロイキン－１受容体関連のキナーゼ１（ＩＲＡＫ１）、リボヌクレアーゼＰ／ＭＲＰサブユニットタンパク質ＰＯＰ５（ＰＯＰ５）、ペプチド－Ｎ（

４）－（Ｎ－アセチル－ベーターグルコサミニル）アスパラギン（ＮＧＬＹ１）、カスパーゼ－２（ＣＡＳＰ２）、リボソームタンパク質Ｓ６キナーゼアルファ－３（ＲＰＳ６ＫＡ３）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＵＢＲ１（ＵＢＲ１）、セリン／トレオニン－プロテインキナーゼＣｈｋ２（ＣＨＥＫ２）、ホスファチジルイノシトール３，４，５－トリスホスファート５－ホスファ（ＩＮＰＰＬ１）、ヒストンアセチルトランスフェラーゼｐ３００（ＥＰ３００）、クレアチンキナーゼＵ型（ミトコンドリア）（ＣＫＭＴ１Ｂ）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＴＲＥＶＩ３３（ＴＲＩＭ３３）、癌関連のヌクレオシド－トリフォスファターゼ（ＮＴＰＣＲ）、アコニット酸ヒドラターゼ（ミトコンドリア）（ＡＣ０２）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ３４（ＵＳＰ３４）、高可能性Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＨＥＲＣ４（ＨＥＲＣ４）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼＨＥＣＴＤ１（ＨＥＣＴＤ１）、ペルオキシゾーム２，４－ジエノイル－ＣｏＡレダクターゼ（ＤＥＣＲ２）、ヘリカーゼＡＲＩＰ４（ＲＡＤ５４Ｌ２）、ユビキチン様修飾酵素活性化酵素７（ＵＢＡ７）、ＥＲ分解促進アルファ－マンノシダーゼ様３（ＥＤＥＭ３）、ユビキチン結合酵素Ｅ２０（ＵＢＥ２Ｏ）、二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰ２Ｋ７）、ミオチューブラリン関連のタンパク質１（ＭＴＭＲ１）、カルシウム依存性ホスホリパーゼＡ２（ＰＬＡ２Ｇ５）、有系分裂チェックポイントセリン／トレオニン－プロテインキナーゼ（ＢＵＢ１Ｂ）、推定トランスフェラーゼＣＡＦ１７（ミトコンドリア）（ＩＢＡ５７）、チロシン－タンパク質キナーゼＺＡＰ－７０（ＺＡＰ７０）、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼペリノ（ｐｅｌｌｉｎｏ）相同体１（ＰＥＬＩ１）、神経障害標的エステラーゼ（ＰＮＰＬＡ６）、リボソームタンパク質Ｓ６キナーゼアルファ－３（ＲＰＳ６ＫＡ３）、Ｎ６－アデノシン－メチルトランスフェラーゼ７０ｋＤａサブユニット（ＭＥＴＴＬ３）、フルクトサミン－３－キナーゼ（ＦＮ３Ｋ）、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ２２（ＵＳＰ２２）、Ｒａｂ３ ＧＴＰアーゼ活性化タンパク質触媒サブユニット（ＲＡＢ３ＧＡＰ１）、カスパーゼ－５（ＣＡＳＰ５）、Ｌ－２－ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ（ミトコンドリア）（Ｌ２ＨＧＤＨ）、サッカロピンデヒドロゲナーゼ様オキシドレダクターゼ（ＳＣＣＰＤＨ）、ＦＬＡＤ１ ＦＡＤシンターゼ、リシン特異的デメチラーゼ３Ａ（ＫＤＭ３Ａ）、またはユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ３４（ＵＳＰ３４）を含む。

【０１５８】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、シグナル伝達タンパク質である。幾つかの事例では、典型的なシグナル伝達タンパク質は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）タンパク質またはレドックスシグナル伝達に関係するタンパク質を含む。典型的なＶＥＧＦタンパク質は、ＶＥＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、ＶＥＧＦ－Ｄ、およびＰＧＦを含む。典型的なレドックスシグナル伝達に関係するタンパク質は、酸化還元調節タンパク質ＦＡＭ２１３Ａを含む。

【０１５９】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、転写因子または制御因子である。転写因子および制御因子としての典型的なシステイン含有タンパク質は、限定されないが、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ３（ＲＰＳ３）、塩基性ロイシンジッパーおよびＷ２ドメイン含有タンパク質（ＢＺＷ１）、ポリ（ｒＣ）結合タンパク質１（ＰＣＢＰ１）、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ１１（ＲＰＳ１１）、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ４、Ｘアイソフォーム（ＲＰＳ４Ｘ）、シグナル識別粒子９ｋＤａタンパク質（ＳＲＰ９）、非ＰＯＵドメイン含有オクタマー結合タンパク質（ＮＯＮＯ）、Ｎ－アルファ－アセチルトランスフェラーゼ１５、ＮａｔＡ補助サブユニット（ＮＡＡ１５）、切断刺激因子サブユニット２（ＣＳＴＦ２）、ラミナ関連のポリペプチド２、アイソフォームアルファ（ＴＭＰＯ）、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｒ（ＨＮＲＮＰＲ）、ＭＭＳ１９ヌクレオチド除去修復タンパク質相同体（ＭＭＳ１９）、ＳＷＩ／ＳＮＦ複合体サブユニットＳＭＡＲＣＣ２（ＳＭＡＲＣＣ２）、ｍＲＮＡデキャッピングタンパク質３（ＥＤＣ３）のエンハンサー、Ｈ／ＡＣＡリボヌクレオタンパク質複合体サブユニット２（ＮＨＰ２）、コイ

ルドコイルを有するWWドメイン含有アダプタータンパク質（ＷＡＣ）、Ｎ－アルファ－アセチルトランスフェラーゼ１５ＮａｔＡ補助サブユニット（ＮＡＡ１５）、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ１１（ＲＰＳ１１）、シグナル伝達性転写因子１（ＳＴＡＴ１）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ１５）、ラミナ関連のポリペプチド２（アイソフォームアルファ）（ＴＭＰＯ）、ＭＭＳ１９ヌクレオチド除去修復タンパク質相同体（ＭＭＳ１９）、ＤＮＡミスマッチ修復タンパク質Ｍｓｈ２（ＭＳＨ２）、無毛の組換え結合タンパク質抑制因子（ＲＢＰＪ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ１７）、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｕ（ＨＮＲＮＰＵ）、転写開始因子ＩＩＡサブユニット２（ＧＴＦ２Ａ２）、クロマチンアクセシビリティ複合タンパク質１（ＣＨＲＡＣ１）、ＣＤＫＮ２Ａ相互作用タンパク質（ＣＤＫＮ２ＡＩＰ）、亜鉛フィンガータンパク質２１７（ＺＮＦ２１７）、シグナル伝達性転写因子３（ＳＴＡＴ３）、ＷＤリピートおよびＨＭＧ－ボックスＤＮＡ結合タンパク質１（ＷＤＨＤ１）、ラミナ関連のポリペプチド２（アイソフォームアルファ）（ＴＭＰＯ）、ラミナ関連のポリペプチド２（アイソフォームベータ／ガンマ）（ＴＭＰＯ）、インターフェロン調節因子４（ＩＲＦ４）、タンパク質フライトレス（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｌｉｇｈｔｌｅｓｓ）－１相同体（ＦＬＵ）、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｆ（ＨＮＲＮＰＦ）、側坐核関連のタンパク質１（ＮＡＣＣ１）、転写伸長制御因子１（ＴＣＥＲＧ１）、タンパク質ＨＥＸＩＭ１（ＨＥＸＦＭ１）、ｍＲＮＡデキャッピングタンパク質のエンハンサー（ＥＤＣ３）、亜鉛フィンガータンパク質Ａｉｏｌｏｓ（ＩＫＺＦ３）、転写伸長因子ＳＰＴ５（ＳＵＰＴ５Ｈ）、フォークヘッドボックスタンパク質Ｋ１（ＦＯＸＫ１）、ＬＥＶＩドメイン含有タンパク質１（ＬＦＭＤ１）、ＭＭＳ１９ヌクレオチド除去修復タンパク質相同体（ＭＭＳ１９）、エロンゲーター（Ｅｌｏｎｇａｔｏｒ）複合タンパク質４（ＥＬＰ４）、アンキリンリピートおよびＫＨドメイン含有タンパク質１（ＡＮＫＨＤｌ）、ＰＭＬ、核因子ＮＦ－カッパ－Ｂ ｐｉ ００サブユニット（ＮＦＫＢ２）、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Ｌ様（ＨＮＲＰＬＬ）、ＣＣＲ４－ＮＯＴ転写複合体サブユニット３（ＣＮＯＴ３）、ＰＰＡＲ－ガンマ様タンパク質の構成的コアクチベーター（ＦＡＭ１２０Ａ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ１５）、６０Ｓリボソームタンパク質Ｌ７（ＲＰＬ７）、インターフェロン調節因子８（ＩＲＦ８）、ＣＯＵＰ転写因子２（ＮＲ２Ｆ２）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ１）、ｔＲＮＡ（ウラシル－５－）－メチルトランスフェラーゼＡ（ＴＲＭＴ２Ａ）、転写因子ｐ６５（ＲＥＬＡ）、エキソソーム複合成分ＲＲＰ４２　（ＥＸＯＳＣ７）、基本転写因子３Ｃポリペプチド１（ＧＴＦ３Ｃ１）、マザーズ・アゲインスト・デカペンタプレジック相同体（Ｍｏｔｈｅｒｓ ａｇａｉｎｓｔ ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ ｈｏｍｏｌｏｇ）２（ＳＭＡＤ２）、アンキリンリピートドメイン含有タンパク質１７（ＡＮＫＲＤ１７）、ＭＭＳ１９ヌクレオチド除去修復タンパク質相同体（ＭＭＳ１９）、デスドメイン関連のタンパク質（ＤＡＸＸ）、亜鉛フィンガータンパク質３１８（ＺＮＦ３１８）６、チオレドキシン相互作用タンパク質（ＴＸＮＩＰ）、グルココルチコイド受容体（ＮＲ３Ｃ１）、鉄応答要素結合タンパク質２（ＩＲＥＢ２）、亜鉛フィンガータンパク質２９５（ＺＮＦ２９５）、ポリコームタンパク質ＳＵＺ１２（ＳＵＺ１２）、切断刺激因子サブユニット２タウ変異体（ＣＳＴＦ２Ｔ）、Ｃ－ｍｙｃプロモーター結合タンパク質（ＤＥＮＮＤ４Ａ）、ピニン（Ｐｉｎｉｎ）（ＰＮＮ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ９）、ＰＯＵドメイン（クラス２）転写因子２（ＰＯＵ２Ｆ２）、ｍＲＮＡデキャッピングタンパク質のエンハンサー３（ＥＤＣ３）、Ａ－キナーゼアンカータンパク質１（ミトコンドリア）（ＡＫＡＰ１）、転写因子ＲｅｌＢ（ＲＥＬＢ）ＲＮＡポリメラーゼＩＩ関連のタンパク質１（ＲＰＡＰ１）、亜鉛フィンガータンパク質３４６（ＺＮＦ３４６）、染色体関連のキネシンＫＴＦ４Ａ（ＫＴＦ４Ａ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニットのメディエーター（ＭＥＤ１２）、タンパク質ＮＰＡＴ（ＮＰＡＴ）、ロイシンリッチＰＰＲモチーフ含有タンパク質（ミトコンドリア）（ＬＲＰＰＲＣ）、ＡＴフックＤＮＡ結合モチーフ含有タンパク質１（ＡＨＤＣ１）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写サブユニット（Ｍ

ＥＤ１２）のメディエーター、ブロモドメイン含有タンパク質８（ＢＲＤ８）、トリヌクレオチドリピート含有遺伝子６Ｂタンパク質（ＴＮＲＣ６Ｂ）、アリール炭化水素受容体核内輸送体（ＡＲＮＴ）、活性化転写因子７相互作用タンパク質（ＡＴＦ７ＩＰ）、グルココルチコイド受容体（ＮＲ３Ｃ１）、染色体伝達忠実度関係タンパク質１８相同体（ＣＨＴＦ１８）、またはＣ－ｍｙｃプロモーター結合タンパク質（ＤＥＮＮＤ４Ａ）を含む。

【０１６０】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、チャネル、輸送体または受容体である。チャネル、輸送体または受容体としての典型的なシステイン含有タンパク質は、限定されないが、クロライド細胞内チャネルタンパク質４（ＣＬＩＣ４）、エキスポーチン－１（ＸＰＯ１）、チオレドキシン（ＴＸＮ）、タンパク質ＳＥＣ１３相同体（ＳＥＣ１３）、クロライド細胞内チャネルタンパク質１（ＣＬＩＣ１）、グアニンヌクレオチド結合タンパク質サブユニットベーター２（ＧＮＢ２Ｌ１）、ソーティングネキシン－６（ＳＮＸ６）、保存されたオリゴマーゴルジ複合体サブユニット３（ＣＯＧ３）、キャップ結合タンパク質サブユニット１（ＮＣＢＰ１）、細胞質ダイニン１軽中間鎖１（ＤＹＮＣ１ＬＩ１）、ＭＯＢ様タンパク質フォセイン（ｐｈｏｃｅｉｎ）（ＭＯＢ４）、プログラム細胞死６相互作用タンパク質（ＰＤＣＤ６ＩＰ）、グルタレドキシン－１（ＧＬＲＸ）、ＡＴＰシンターゼサブユニットアルファ（ミトコンドリア）（ＡＴＰ５Ａ１）、トリークル（ｔｒｅａｃｌｅ）タンパク質（ＴＣＯＦ１）、ダイナクチンサブユニット１（ＤＣＴＮ１）、インポーチン－７（ＩＰ０７）、エキスポーチン－２（ＣＳＥ１Ｌ）、ＡＴＰシンターゼサブユニットガンマ（ミトコンドリアの）（ＡＴＰ５Ｃ１）、輸送タンパク質粒子複合体サブユニット５（ＴＲＡＰＰＣ５）、チオレドキシンミトコンドリア（ＴＸＮ２）、ＴＨＯ複合体サブユニット６相同体（ＴＨＯＣ６）、エキスポーチン－１（ＸＰＯ１）、核膜孔複合体タンパク質Ｎｕｐ５０（ＮＵＰ５０）、トリークル（ｔｒｅａｃｌｅ）タンパク質（ＴＣＯＦ１）、核膜孔複合体タンパク質Ｎｕｐ９３（ＮＵＰ９３）、核膜孔糖タンパク質ｐ６２（ＮＵＰ６２）、細胞質ダイニン１重鎖１（ＤＹＮＣ１Ｈ１）、チオレドキシン様タンパク質１（ＴＸＮＬ１）、核膜孔複合体タンパク質Ｎｕｐ２１４（ＮＵＰ２１４）、タンパク質ｌｉｎ（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｌｉｎ）－７相同体Ｃ（ＬＩＮ７Ｃ）、ＡＤＰ－リボシル化因子結合タンパク質ＧＧＡ２（ＧＧＡ２）、輸送タンパク質粒子複合体サブユニット４（ＴＲＡＰＰＣ４）、タンパク質クエーキング（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｑｕａｋｉｎｇ）（ＱＫＩ）、ペリリピン－３（ＰＬＩＮ３）、銅輸送タンパク質ＡＴＯＸ１（ＡＴＯＸ１）、特殊なミオシン－Ｉｃ（ＭＹＯＩＣ）、ヌクレオポリンＮＵＰ５３（ＮＵＰ３５）、液胞タンパク質選別関連のタンパク質１８相同体（ＶＰＳ１８）、細胞質分裂タンパク質のデディケイター７（ＤＯＣＫ７）、ヌクレオポリンｐ５４（ＮＵＰ５４）、Ｒａｓ関連のＧＴＰ結合タンパク質Ｃ（ＲＲＡＧＣ）、Ｒｈｏ－ＧＡＰドメインを有するＡｒｆ－ＧＡＰ（ＡＮＫリピートおよびＰＨドメイン）（ＡＲＡＰ１）、エキスポーチン－５（ＸＰＯ５）、キネクチン（ＫＴＮ１）、クロライド細胞内チャネルタンパク質６（ＣＬＩＣ６）、電位開口型カリウムチャネルサブユニットベーター２（ＫＣＮＡＢ２）、エキスポーチン－５（ＸＰＯ５）、Ｒａｓ関連のＧＴＰ結合タンパク質Ｃ（ＲＲＡＧＣ）、リボソーム結合タンパク質１（ＲＲＢＰ１）、アシル－ＣｏＡ結合ドメイン含有タンパク質６（ＡＣＢＤ６）、クロライド細胞内チャネルタンパク質５（ＣＬＩＣ５）、プレクストリン相同ドメイン含有ファミリーＡメンバー（ＰＬＥＫＨＡ２）、ＡＤＰ－リボシル化因子様タンパク質３（ＡＲＬ３）、タンパク質輸送タンパク質Ｓｅｃ２４Ｃ（ＳＥＣ２４Ｃ）、電位依存性アニオン選択的チャネルタンパク質（ＶＤＡＣ３）、プログラム細胞死６相互作用タンパク質（ＰＤＣＤ６ＩＰ）、クロライド細胞内チャネルタンパク質３（ＣＬＩＣ３）、多胞体サブユニット１２Ａ（ＦＡＭ１２５Ａ）、真核生物翻訳開始因子４Ｅ輸送体（ＥＩＦ４ＥＮＩＦ１）、ＮｍｒＡ様ファミリードメイン含有タンパク質１（ＭＲＡＬ１）、核膜孔複合体タンパク質Ｎｕｐ９８－Ｎｕｐ９６（ＮＵＰ９８）、保存されたオリゴマーゴルジ複合体サブユニット１（ＣＯＧ１）、インポーチン－４（ＩＰＯ４）、プレクストリン相同ドメイン含有ファミリーＡメンバー（ＰＬＥＫＨＡ２）、

細胞質ダイニン１重鎖１（ＤＹＮＣ１Ｈ１）、ＤＥＮＮドメイン含有タンパク質１Ｃ（ＤＥＮＮＤ１Ｃ）、細胞質ダイニン１重鎖１（ＤＹＮＣ１Ｈ１）、タンパク質ＥＬＹＳ（ＡＨＣＴＦ１）、輸送タンパク質粒子複合体サブユニット１（ＴＲＡＰＰＣ１）、グアニンヌクレオチド結合タンパク質様３（ＧＮＬ３）、またはインポーチン－１３（ＩＰ０１３）を含む。

【０１６１】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質はシャペロンである。シャペロンとしての典型的なシステイン含有タンパク質は、限定されないが、６０ｋＤａ熱ショックタンパク質（ミトコンドリア）（ＨＳＰＤ１）、Ｔ－複合体タンパク質１サブユニットイータ（ＣＣＴ７）、Ｔ－複合体タンパク質１サブユニットイプシロン（ＣＣＴ５）、熱ショック７０ｋＤａタンパク質４（ＨＳＰＡ４）、ＧｒｐＥタンパク質相同体１（ミトコンドリア）（ＧＲＰＥＬｌ）、チューブリン特異的シャペロンＥ（ＴＢＣＥ）、タンパク質ｕｎｃ－４５相同体Ａ（ＵＮＣ４５Ａ）、セルピンＨ１（ＳＥＲＰＩＮＨ１）、チューブリン特異的シャペロンＤ（ＴＢＣＤ）、ペルオキシソーム形成因子１９（ＰＥＸ１９）、ＢＡＧファミリー分子シャペロン制御因子５（ＢＡＧ５）、Ｔ－複合体タンパク質１サブユニットシータ（ＣＣＴ８）、タンパク質キャノピー相同体３（ＣＮＰＹ３）、ＤｎａＪ相同体サブファミリーＣメンバー１０（ＤＮＡＪＣ１０）、ＡＴＰ依存性Ｃｌｐプロテアーゼ ＡＴＰ結合サブユニットｃｌｐ（ＣＬＰＸ）、またはミダシン（Ｍｉｄａｓｉｎ）（ＭＤＮ１）を含む。

【０１６２】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、アダプター、足場またはモジュレーターのタンパク質である。アダプター、足場またはモジュレーターのタンパク質としての典型的なシステイン含有タンパク質は、限定されないが、プロテアソーム活性化因子複合体サブユニット１（ＰＳＭＥ１）、ＴＩＰ４１様タンパク質（ＴＩＰＲＬ）、Ｃｒｋ様タンパク質（ＣＲＫＬ）、コフィリン－１（ＣＦＬ１）、コンデンシン複合体サブユニット１（ＮＣＡＰＤ２）、翻訳活性化因子ＧＣＮ１（ＧＣＮ１Ｌ１）、セリン／トレオニン－プロテインフォスファターゼ２Ａ ５６ｋＤａ制御性（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、ＵＰＦ０５３９タンパク質Ｃ７ｏｒｆ５９（Ｃ７ｏｒｆ５９）、タンパク質透明相同体（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｉａｐｈａｎｏｕｓ ｈｏｍｏｌｏｇ）１（ＤＩＡＰＨｌ）、タンパク質アサンダー相同体（Ｐｒｏｔｅｉｎ ａｓｕｎｄｅｒ ｈｏｍｏｌｏｇ）（Ａｓｕｎ）、ＲａｓＧＴＰアーゼ活性化様タンパク質ＩＱＧＡＰ１（ＩＱＧＡＰ１）、姉妹染色分体接着タンパク質ＰＤＳ５相同体Ａ（ＰＤＳ５Ａ）、レチクロン（Ｒｅｔｉｃｕｌｏｎ）－４（ＲＴＮ４）、プロテアソーム活性化因子複合体サブユニット４（ＰＳＭＥ４）、コンデンシン複合体サブユニット２（ＮＣＡＰＨ）、姉妹染色分体接着タンパク質ＰＤＳ５相同体Ａ（ＰＤＳ５Ａ）、ｃＡＭＰ依存性タンパク質キナーゼＩ型－アルファ制御性（ＰＲＫＡＲ１Ａ）、宿主細胞因子１（ＨＣＦＣ１）、セリン／トレオニン－プロテインフォスファターゼ４制御性（ＰＰＰ４Ｒ２）、核内のアポトーシスクロマチン凝縮インデューサー（ＡＣＩＮ１）、ＢＲＩＳＣおよびＢＲＣＡ１－Ａ複合体メンバー１（ＢＡＢＡＭ１）、テトラトリコペプチドを有するインターフェロン誘導タンパク質（ＩＦＩＴ３）、Ｒａｓ関連ドメイン含有タンパク質２（ＲＡＳＳＦ２）、Ｈｓｐ７０結合タンパク質１（ＨＳＰＢＰ１）、ＴＢＣ１ドメインファミリーメンバー１５（ＴＢＣ１Ｄ１５）、ダイナミン結合タンパク質（ＤＮＭＢＰ）、コンデンシン複合体サブユニット１（ＮＣＡＰＤ２）、ベーター２－シントロフィン（ＳＮＴＢ２）、Ｄｉｓｋｓ ｌａｒｇｅ相同体（Ｄｉｓｋｓ ｌａｒｇｅ ｈｏｍｏｌｏｇ）１（ＤＬＧ１）、ＴＢＣ１ドメインファミリーメンバー１３（ＴＢＣ１Ｄ１３）、フォルミン（Ｆｏｒｍｉｎ）結合タンパク質１様（ＦＮＢＰ１Ｌ）、翻訳活性化因子ＧＣＮ１（ＧＣＮ１Ｌ１）、ＧＲＢ２関連のアダプタータンパク質（ＧＲＡＰ）、Ｇ２／有系分裂特異的サイクリン－Ｂ１（ＣＣＮＢ１）、ミオチューブラリン関連のタンパク質１２（ＭＴＭＲ１２）、タンパク質ＦＡＤＤ（ＦＡＤＤ）、翻訳活性化因子ＧＣＮ１（ＧＣＮ１Ｌ１）、Ｗｉｎｇｓ ａｐａｒｔ様タンパク質相同体（Ｗｉｎｇｓ ａｐａｒｔ－ｌｉｋｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｈｏｍｏｌｏｇ）（ＷＡＰＡＬ）、ｃＡＭＰ依存性タ

ンパク質キナーゼＩＩ型ベータ制御性（ＰＲＫＡＲ２Ｂ）、Ｍａｌｃａｖｅｒｎｉｎ（ＣＣＭ２）、ＭＰＰ１　５５ｋＤａ赤血球膜タンパク質、アクチンフィラメント関連タンパク質１（ＡＦＡＰ１）、テンシン－３（ＴＮＳ３）、ｔＲＮＡメチルトランスフェラーゼ１１２相同体（ＴＲＭＴ１１２）、シンプレキン（Ｓｙｍｐｌｅｋｉｎ）（ＳＹＭＰＫ）、ＴＢＣ１ドメインファミリーメンバー２Ａ（ＴＢＣ１Ｄ２）、ＡＴＲ相互作用タンパク質（ＡＴＲＩＰ）、アタキシン－１０（ＡＴＸＮ１０）、コハク酸デヒドロゲナーゼ会合因子２（ミトコンドリア）（ＳＤＨＡＦ２）、フォルミン結合タンパク質１（ＦＮＢＰ１）、ミオチューブラリン関連のタンパク質１２（ＭＴＭＲ１２）、テトラトリコペプチドを有するインターフェロン誘導タンパク質（ＩＦＩＴ３）、タンパク質ＣＢＦＡ２Ｔ２（ＣＢＦＡ２Ｔ２）、好中球細胞質因子（Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌ　ｃｙｔｏｓｏｌ　ｆａｃｔｏｒ）１（ＮＣＦ１）、またはタンパク質ｓｙｎｄｅｓｍｏｓ（Ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｙｎｄｅｓｍｏｓ）（ＮＵＤＴ１６Ｌ１）を含む。

【０１６３】

幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表１－５または表７－９に例示されるタンパク質を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表１に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表１に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表２に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表２に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表３に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表３に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表４に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表４に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表５に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表５に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表７に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表７に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表８に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表８に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表９に例示されるタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質は、表９に示されるシステイン残基を含む。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は修飾タンパク質であり、ここでタンパク質は、本明細書に記載される小分子断片によって、例えば、本明細書に記載される式（Ｉ）の小分子断片、本明細書に記載される式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブ、または図３に例示される小分子断片によって、システイン残基部位で修飾される。

【０１６４】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載される。幾つかの事例では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。

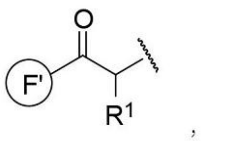
幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表３に示される。幾つかの場合では、表３から選択されるシステイン含有タンパク質は、表３に示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＸＰＯ１、ＫＤＭ４Ｂ、Ｒ３Ｃ１、ＧＳＴＰ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＧＮＢ２Ｌ１、ＩＲＦ４、ＵＳＰ３４、ＺＣ３ＨＡＶ１、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＤＣＵＮ１Ｄ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＲＲＡＧＣ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、またはＵＳＰ１６から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＸＰＯ１、ＧＳＴＰ１、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＩＲＦ４、ＺＣ３ＨＡＶ１、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＲＲＡＧＣ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、ま

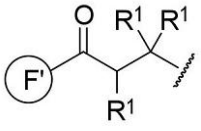
たはＵＳＰ１６から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＫＤＭ４Ｂ、ＮＲ３Ｃ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＵＳＰ７、またはＵＳＰ２２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＧＮＢ２Ｌ１またはＵＳＰ３４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＤＣＵＮ１Ｄ１である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＧＳＴＰ１、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＺＣ３ＨＡＶ１またはＲＲＡＧＣから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＸＰＯ１、ＧＮＢ２Ｌ１、ＵＳＰ３４、ＵＢＥ２Ｏ、ＭＬＴＫまたはＵＳＰ２２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＫＤＭ４ＢまたはＮＲ３Ｃ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＴＮＦＡＩＰ３、ＵＳＰ７、ＵＳＰ２８、ＫＤＭ３ＡまたはＵＳＰ１６から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＩＲＦ４、ＰＥＬＩ１、ＤＣＵＮ１Ｄ１またはＵＳＰ２２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＡＩＰである。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素は、ＩＫＢＫＢ、ＫＤＭ４Ｂ、ＧＳＴＰ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、またはＵＳＰ１６から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子は、ＮＲ３Ｃ１、ＩＲＦ４またはＺＣ３ＨＡＶ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、チャネル、輸送体、または受容体であり、チャネル、輸送体、または受容体は、ＧＮＢ２Ｌ１またはＲＲＡＧＣから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＸＰＯ１またはＤＣＵＮ１Ｄ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、ＵＢＥ２Ｌ６、ＸＰＯ１、ＡＤＡ、ＮＲ３Ｃ１、ＰＯＵ２Ｆ２、ＵＣＨＬ３、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＬＲＢＡ、ＵＢＥ２Ｌ３、ＲＥＬＢ、ＩＲＦ８、ＣＡＳＰ８、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＰＤＥ１２、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ４８、ＳＭＡＲＣＣ２またはＳＡＭＨＤ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、Ｒ３Ｃ１、ＵＣＨＬ３、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＣＡＳＰ２、ＬＲＢＡ、ＵＢＥ２Ｌ３、ＲＥＬＢ、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＵＳＰ４８またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＵＢＥ２Ｌ６、ＰＯＵ２Ｆ２、ＭＧＭＴ、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ８、ＰＤＥ１２またはＵＳＰ３４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１またはＸＰＯ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＤＡ、ＭＧＭＴ、ＩＤＨ２、ＩＲＦ８またはＳＡＭＨＤ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、ＸＰＯ１、Ｒ３Ｃ１またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＵＢＥ２Ｌ６、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１またはＵＳＰ４８から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＤＡ、ＲＥＬＢまたはＵＳＰ３４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＵＣＨＬ３、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＬＲＢＡ、ＣＡＳＰ８、ＰＣＫ２またはＰＤＥ１２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＭＧＭＴ、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＵＢＥ２Ｌ３またはＩＲＦ８から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＦＫＦＢ４、ＡＣＡＴ１またはＳＴＡＴ３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＯＵ２Ｆ２、ＰＤＩＡ６またはＳＡＭＨＤ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素は、ＵＢＥ２Ｌ６、ＡＤＡ、ＵＣＨＬ３、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＵＢＥ２Ｌ３、ＣＡＳＰ８、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＰＤＥ１２、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ４８またはＳＡＭＨＤ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子は、Ｒ３Ｃ１、ＰＯＵ２Ｆ２、ＳＴＡＴ３、ＲＥＬＢ、ＩＲＦ８またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。幾つかの場

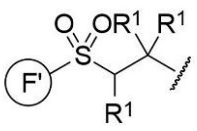
合では、システイン含有タンパク質は、ＺＡＰ７０、ＰＲＫＣＱまたはＰＲＭＴ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＺＡＰ７０またはＰＲＫＣＱから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＺＮＦ２１７、ＮＣＦ１、ＩＲＥＢ２、ＬＲＢＡ、ＣＤＫ５、ＥＰ３００、ＥＺＨ２、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１、ＲＲＡＧＣまたはＩＲＡＫ４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＺＮＦ２１７、ＩＲＥＢ２、ＥＰ３００、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１、ＲＲＡＧＣまたはＩＲＡＫ４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＮＣＦ１、ＬＲＢＡまたはＣＤＫ５から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＥＺＨ２である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＺＮＦ２１７、ＮＣＦ１、ＣＤＫ５、ＥＰ３００またはＩＲＡＫ４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＩＲＥＢ２、ＬＲＢＡまたはＵＢＥ２Ｓから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＥＺＨ２、ＶＣＰＩＰ１またはＲＲＡＧＣから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素は、ＣＤＫ５、ＥＰ３００、ＥＺＨ２、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１またはＩＲＡＫ４から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子は、ＺＮＦ２１７またはＩＲＥＢ２から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、アダプター、足場タンパク質またはモジュレータータンパク質であり、アダプター、足場タンパク質またはモジュレータータンパク質はＮＣＦ１から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、チャネル、輸送体または受容体であり、チャネル、輸送体または受容体はＲＲＡＧＣから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１またはＬＲＢＡから選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は構造ＳＲを有し、ここでＲは、

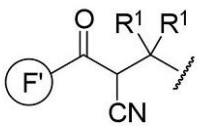
【０１６５】

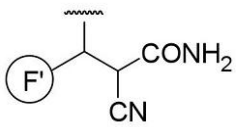
【化４７】



、


、


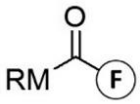
、


、又は


から選択され、式中、Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１６６】

【化４８】



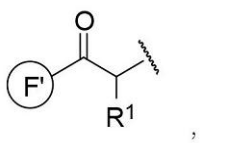
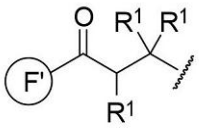
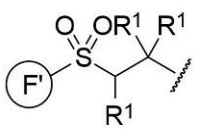
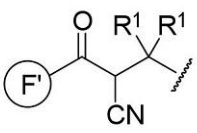
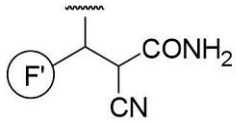
であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは、化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１６７】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、ここでシステイン含有タンパク質は、表１０Ａ（酵素）から選択される。幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表１０Ａに示される。幾つかの場合では、表１０Ａから選択されるシステイン含有タンパク質は、表１０Ａに示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、

【０１６８】

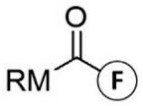
【化４９】


、

、

、

、又は


から選択され、式中、Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１６９】

【化５０】



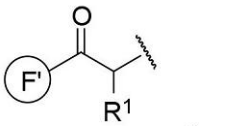
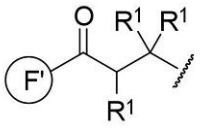
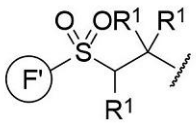
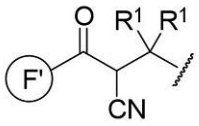
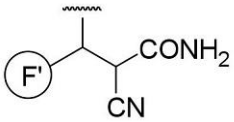
であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１７０】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、ここでシステイン含有タンパク質は、表１０Ｂ（転写因子および制御因子）から選択される。幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表１０Ｂに示される。幾つかの場合では、表１０Ｂから選択されるシステイン含有タンパク質は、表１０Ｂに示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、

【０１７１】

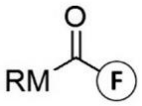
【化５１】


、

、

、

、又は


から選択され、ここでＲ[1]は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１７２】

【化５２】



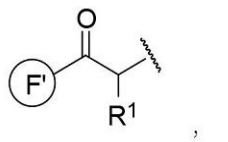
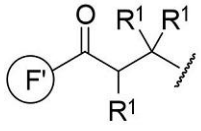
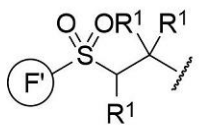
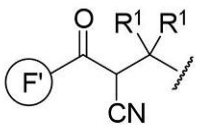
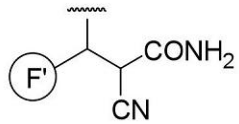
であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１７３】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、ここでシステイン含有タンパク質は、表１０Ｃ（チャネル、輸送体または受容体）から選択される。幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表１０Ｃに示される。幾つかの場合では、表１０Ｃから選択されるシステイン含有タンパク質は、表１０Ｃに示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、

【０１７４】

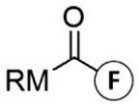
【化５３】


，

，

，

，又は


から選択され、式中、Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１７５】

【化５４】



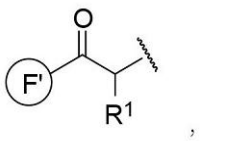
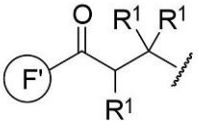
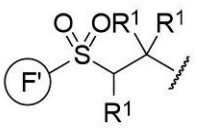
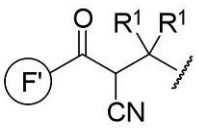
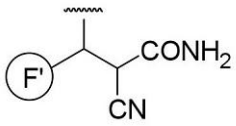
であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１７６】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、ここでシステイン含有タンパク質は、表１０Ｄ（アダプター、足場またはモジュレーターのタンパク質）から選択される。幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表１０Ｄに示される。幾つかの場合では、表１０Ｄから選択されるシステイン含有タンパク質は、表１０Ｄに示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、

【０１７７】

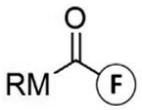
【化５５】


、

、

、

、又は


から選択され、式中、Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１７８】

【化５６】



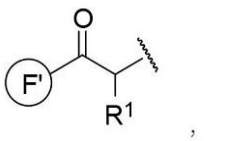
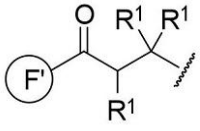
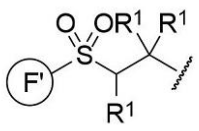
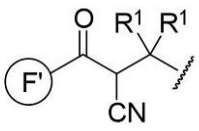
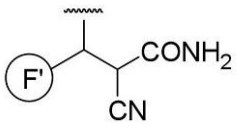
であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１７９】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、ここでシステイン含有タンパク質は、表１０Ｅから選択される。幾つかの場合では、各それぞれのシステイン含有タンパク質の１つ以上のシステイン残基が、表１０Ｅに示される。幾つかの場合では、表１０Ｅから選択されるシステイン含有タンパク質は、表１０Ｅに示される少なくとも１つのシステイン部位で小分子断片によって修飾され、修飾されたシステイン含有タンパク質が生成される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの場合では、修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、

【０１８０】

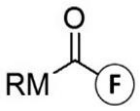
【化５７】


，

，

，

，又は


から選択され、式中、Ｒ[1]は、Ｈ、Ｃ　１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦ’は小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：

【０１８１】

【化５８】



であり、式中、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、システイン含有タンパク質に可逆的に結合する。

【０１８２】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_PC^*Zを含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＸＰＯ１、ＫＤＭ４Ｂ、ＮＲ３Ｃ１、ＧＳＴＰ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＧＮＢ２Ｌ１、ＩＲＦ４、ＵＳＰ３４、ＺＣ３ＨＡＶ１、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＤＣＵＮ１Ｄ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＲＲＡＧＣ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、またはＵＳＰ１６から選択される。

【０１８３】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_PC^*X_n$を含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびX_nは無極性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＸＰＯ１、ＧＳＴＰ１、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＩＲＦ４、ＺＣ３ＨＡＶ１、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＲＲＡＧＣ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、またはＵＳＰ１６から選択される。

【０１８４】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_PC^*X_P$を含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示す。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＫＤＭ４Ｂ、ＮＲ３Ｃ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＵＳＰ７またはＵＳＰ２２から選択される。

【０１８５】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_PC^*X_b$を含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＸは塩基性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＧＮＢ２Ｌ１またはＵＳＰ３４から選択される。

【０１８６】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_PC^*X_a$を含み、ここでX_Pは極性残基であり、

Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＸ$_{a}$は酸性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＤＣＵＮ１Ｄ１である。

【０１８７】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＳＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＩＫＢＫＢ、ＧＳＴＰ１、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＺＣ３ＨＡＶ１またはＲＲＡＧＣから選択される。

【０１８８】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＮＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＸＰＯ１、ＧＮＢ２Ｌ１、ＵＳＰ３４、ＵＢＥ２Ｏ、ＭＬＴＫまたはＵＳＰ２２から選択される。

【０１８９】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＹＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＫＤＭ４ＢまたはＲ３Ｃ１から選択される。

【０１９０】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＴＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＴＮＦＡＩＰ３、ＵＳＰ７、ＵＳＰ２８、ＫＤＭ３ＡまたはＵＳＰ１６から選択される。

【０１９１】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＱＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＩＲＦ４、ＰＥＬＩ１、ＤＣＵＮ１Ｄ１またはＵＳＰ２２から選択される。

【０１９２】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＣＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＡＩＰである。

【０１９３】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素はモチーフＸ$_{P}$Ｃ＊Ｚを含み、ここでＸ$_{P}$は極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、酵素

は、ＩＫＢＫＢ、ＫＤＭ４Ｂ、ＧＳＴＰ１、ＴＮＦＡＩＰ３、ＡＣＡＴ１、ＩＲＡＫ１、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ７、ＰＥＬＩ１、ＵＳＰ２８、ＵＢＥ２Ｏ、ＭＬＴＫ、ＵＳＰ２２、ＫＤＭ３Ａ、またはＵＳＰ１６から選択される。

【０１９４】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子はモチーフX_PC^*Zを含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、転写因子または制御因子は、Ｒ３Ｃ１、ＩＲＦ４またはＺＣ３ＨＡＶ１から選択される。

【０１９５】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はチャネル、輸送体または受容体であり、チャネル、輸送体または受容体はモチーフX_PC^*Zを含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、チャネル、輸送体または受容体は、ＧＮＢ２Ｌ１またはＲＲＡＧＣから選択される。

【０１９６】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_PC^*Zを含み、ここでX_Pは極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＩＰ、ＰＥＳ１、ＸＰＯ１またはＤＣＵＮ１Ｄ１から選択される。

【０１９７】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_nC^*Zを含み、ここでX_nは無極性残基であり、C^*は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、ＵＢＥ２Ｌ６、ＸＰＯ１、ＡＤＡ、Ｒ３Ｃ１、ＰＯＵ２Ｆ２、ＵＣＨＬ３、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＬＲＢＡ、ＵＢＥ２Ｌ３、ＲＥＬＢ、ＩＲＦ８、ＣＡＳＰ８、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＰＤＥ１２、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ４８、ＳＭＡＲＣＣ２またはＳＡＭＨＤ１から選択される。

【０１９８】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_nC^*X_n$を含み、ここでX_nは無極性残基であり、C^*は修飾の部位を示す。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、Ｒ３Ｃ１、ＵＣＨＬ３、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＣＡＳＰ２、ＬＲＢＡ、ＵＢＥ２Ｌ３、ＲＥＬＢ、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＵＳＰ４８またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。

【０１９９】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフ$X_nC^*X_P$を含み、ここでX_nは無極性残基であり

、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＸ$_{p}$は極性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＵＢＥ２Ｌ６、ＰＯＵ２Ｆ２、ＭＧＭＴ、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ８、ＰＤＥ１２またはＵＳＰ３４から選択される。

【０２００】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＸ$_{n}$Ｃ＊Ｘ$_{a}$を含み、ここでＸ$_{n}$は無極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＸ$_{a}$は酸性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１またはＸＰＯ１から選択される。

【０２０１】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＸ$_{n}$Ｃ＊Ｘ$_{b}$を含み、ここでＸ$_{n}$は無極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＸは塩基性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＤＡ、ＭＧＭＴ、ＩＤＨ２、ＩＲＦ８またはＳＡＭＨＤ１から選択される。

【０２０２】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＬＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、ＸＰＯ１、Ｒ３Ｃ１またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。

【０２０３】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＰＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＵＢＥ２Ｌ６、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１またはＵＳＰ４８から選択される。

【０２０４】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＧＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＡＤＡ、ＲＥＬＢまたはＵＳＰ３４から選択される。

【０２０５】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＡＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＵＣＨＬ３、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＬＲＢＡ、ＣＡＳＰ８、ＰＣＫ２またはＰＤＥ１２から選択される。

【０２０６】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＶＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚ

は任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＭＧＭＴ、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＵＢＥ２Ｌ３またはＩＲＦ８から選択される。

【０２０７】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＩＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＦＫＦＢ４、ＡＣＡＴ１またはＳＴＡＴ３から選択される。

【０２０８】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_rC^*Zを含み、ここでX_rは芳香族残基を示し、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＯＵ２Ｆ２、ＰＤＩＡ６またはＳＡＭＨＤ１から選択される。

【０２０９】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素はモチーフX_nC^*Zを含み、ここでX_nは無極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、酵素は、ＵＢＥ２Ｌ６、ＡＤＡ、ＵＣＨＬ３、ＭＧＭＴ、ＥＲＣＣ３、ＡＣＡＴ１、ＵＢＡ７、ＣＡＳＰ２、ＩＤＨ２、ＵＢＥ２Ｌ３、ＣＡＳＰ８、ＰＤＩＡ６、ＰＣＫ２、ＰＦＫＦＢ４、ＰＤＥ１２、ＵＳＰ３４、ＵＳＰ４８またはＳＡＭＨＤ１から選択される。

【０２１０】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子はモチーフX_nC^*を含み、ＺここでX_nは無極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、転写因子または制御因子は、Ｒ３Ｃ１、ＰＯＵ２Ｆ２、ＳＴＡＴ３、ＲＥＬＢ、ＩＲＦ８またはＳＭＡＲＣＣ２から選択される。

【０２１１】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_nC^*Zを含み、ここでX_nは無極性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＰＥＳ１、ＣＹＲ６１、ＸＰＯ１またはＬＲＢＡから選択される。

【０２１２】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_aC^*Zを含み、ここでX_aは酸性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＺＡＰ７０、ＰＲＫＣＱまたはＰＲＭＴ１から選択される。

【０２１３】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に

共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＥＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＺＡＰ７０またはＰＲＫＣＱから選択される。

【０２１４】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＺＮＦ２１７、ＮＣＦ１、ＩＲＥＢ２、ＬＲＢＡ、ＣＤＫ５、ＥＰ３００、ＥＺＨ２、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１、ＲＲＡＧＣまたはＩＲＡＫ４から選択される。

【０２１５】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_bＣ＊X_nを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびX_nは無極性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＺＮＦ２１７、ＩＲＥＢ２、ＥＰ３００、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１、ＲＲＡＧＣまたはＩＲＡＫ４から選択される。

【０２１６】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_bＣ＊X_Pを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびX_Pは極性残基である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＮＣＦ１、ＬＲＢＡまたはＣＤＫ５から選択される。

【０２１７】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_bＣ＊Ｘを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示す。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質はＥＺＨ２である。

【０２１８】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＲＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＺＮＦ２１７、ＮＣＦ１、ＣＤＫ５、ＥＰ３００またはＩＲＡＫ４から選択される。

【０２１９】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＫＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１、ＩＲＥＢ２、ＬＲＢＡまたはＵＢＥ２Ｓから選択される。

【０２２０】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフＨＣ＊Ｚを含み、ここでＣ＊は修飾の部位を示し、Ｚは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＥＺＨ２、ＶＣＰＩＰ１またはＲＲＡＧＣから選択される。

【０２２１】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は酵素であり、酵素はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、酵素は、ＣＤＫ５、ＥＰ３００、ＥＺＨ２、ＵＢＥ２Ｓ、ＶＣＰＩＰ１またはＩＲＡＫ４から選択される。

【０２２２】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質は転写因子または制御因子であり、転写因子または制御因子はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、転写因子または制御因子は、ＺＮＦ２１７またはＩＲＥＢ２から選択される。

【０２２３】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はアダプター、足場タンパク質またはモジュレータータンパク質であり、アダプター、足場タンパク質またはモジュレータータンパク質はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、アダプター、足場タンパク質またはモジュレータータンパク質は、ＮＣＦ１から選択される。

【０２２４】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はチャネル、輸送体または受容体であり、チャネル、輸送体または受容体はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、チャネル、輸送体または受容体は、ＲＲＡＧＣから選択される。

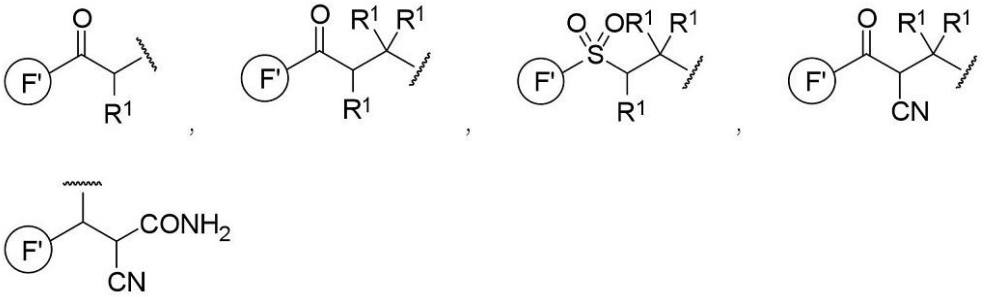
【０２２５】

幾つかの事例において、本明細書には、システイン含有タンパク質のシステイン残基に共有結合している小分子断片を含む修飾されたシステイン含有タンパク質が記載され、システイン含有タンパク質はモチーフX_bＣ＊Ｚを含み、ここでX_bは塩基性残基であり、Ｃ＊は修飾の部位を示し、およびＺは任意のアミノ酸である。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、表３から選択される。幾つかの場合では、システイン含有タンパク質は、ＣＹＲ６１またはＬＲＢＡから選択される。

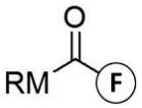
【０２２６】

幾つかの場合では、上に記載されるシステイン含有タンパク質は、長さが約２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、

７００、８００、９００、１０００またはそれ以上のアミノ酸残基を含む。
【０２２７】
幾つかの場合では、上に記載される修飾されたシステイン含有タンパク質のシステイン残基は、構造ＳＲを有し、ここでＲは、
【０２２８】
【化５９】

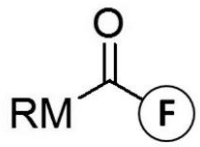


から選択され、式中、Ｒ[1]は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ３アルキル、またはアリールであり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、小分子断片は、約１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００ダルトン、またはそれ以上の分子量を有する。幾つかの場合では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、非金属、または遷移金属での富化前のものである。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、炭素および水素の原子に基づいて及び随意に窒素、酸素及び／又は硫黄の原子にさらに基づいて計算される。幾つかの実施形態では、小分子断片の分子量は、ハロゲン、遷移金属またはその組み合わせの分子量を含まない。幾つかの場合では、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片：
【０２２９】
【化６０】



であり、ここで、ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；およびＦは小分子断片部分である。幾つかの場合では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの場合では、小分子断片は、上に記載されるシステイン含有タンパク質に不可逆的に結合する。幾つかの場合では、小分子断片は、上に記載されるシステイン含有タンパク質に可逆的に結合する。
【０２３０】
＜組成物、細胞、および細胞集団＞
本明細書にはまた、システイン含有タンパク質に結合された小分子断片の組成物、システイン含有タンパク質に結合されたシステイン反応性プローブ、および処理されたサンプル組成物が開示される。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される組成物は、式（Ｉ）の小分子断片を含み：
【０２３１】

【化６１】



式(I)

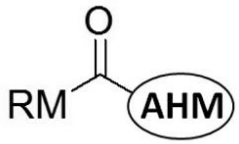
式中：
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；および
Ｆは小分子断片部分であり；および
組成物はさらに、小分子断片に対する共有結合であるシステイン含有タンパク質を含む。

【０２３２】

幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブを含む組成物が記載され：

【０２３３】

【化６２】



式(II)

式中：
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基に対する共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；および
ＡＨＭは親和性ハンドル部分であり；および
組成物はさらに、システイン反応性プローブに対する共有結合であるシステイン含有タンパク質を含む。

【０２３４】

幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、単離された細胞または組織サンプルである単離されたサンプル；および単離されたサンプル中に発現されたシステイン含有タンパク質と相互作用するその能力に関して分析されるシステイン反応性プローブを含む組成物が記載される。

【０２３５】

本明細書にはさらに、単離された処理した細胞および細胞集団が開示される。幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質に共有結合されたシステイン反応性プローブを含む単離された処理した細胞が記載される。幾つかの事例では、単離された処理した細胞は、システイン反応性プローブのセットをさらに含み、ここでシステイン反応性プローブの各々は、システイン含有タンパク質に共有結合される。

【０２３６】

幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質に共有結合された小分子断片を含む単離された処理した細胞が記載される。幾つかの事例では、単離された処理した細胞は、小分子断片のセットをさらに含み、ここで小分子断片の各々は、システイン含有タンパク質に共有結合される。幾つかの事例では、単離された処理した細胞はさらに、システイン反応性プローブを含む。幾つかの事例では、単離された処理した細胞はさらに、システイン反応性プローブのセットを含む。

【０２３７】

幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、システイン含有タンパク質に共有結合されたシステイン反応性プローブのセットを含む細胞の単離された処理した集団が記載される。

【０２３８】

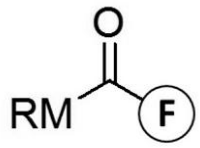
幾つかの実施形態において、本明細書にはさらに、システイン含有タンパク質に共有結合された小分子断片のセットを含む細胞の単離された処理した集団が記載される。幾つかの事例では、細胞の単離された処理した集団はさらに、システイン反応性プローブのセットを含む。

【０２３９】

本明細書の他のところに開示されるように、小分子断片は式（Ｉ）の小分子断片であり：

【０２４０】

【化６３】



式(I)

式中：

ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基との共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；および

Ｆは小分子断片部分である。

【０２４１】

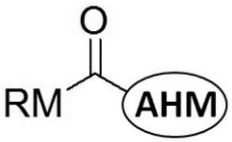
幾つかの事例では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの場合では、Ｆは化合物ライブラリーから得られる。幾つかの実施形態では、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ Ｐｌａｔｆｏｒｍ Ｆｒａｇｍｅｎｔ －Ｂａｓｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎからのＦＲＧｘ、ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｌａｇ、ＡＳＩＮＥＸからのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒからのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ Ｂｉｏからの Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔライブラリー、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、ｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＯＴＡＶＡ断片ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙからのＡｌｌｉｕｍ、またはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。幾つかの場合では、Ｆは、図３に例示される小分子断片部分である。幾つかの場合では、Ｆは、Ｆをカルボニル部分に結合させるリンカー部分をさらに含む。幾つかの実施形態では、小分子断片は、図３に例示される小分子断片部分である。

【０２４２】

本明細書の他のところに記載されるように、システイン反応性プローブは、式（ＩＩ）のシステイン反応性プローブであり：

【０２４３】

【化６４】



式(II)

式中：
ＲＭは、マイケル受容体部分、脱離基部分、またはシステイン残基のチオール基に対する共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり；および
ＡＨＭは親和性ハンドル部分である。

【０２４４】

幾つかの実施形態では、マイケル受容体部分は、アルケンまたはアルキンの部分を含む。幾つかの事例では、親和性ハンドル部分は、親和性ハンドル、およびシステイン含有タンパク質のシステイン残基に対するシステイン反応性プローブの共有結合の相互作用を促進する結合部分を含む。幾つかの場合では、結合部分は、化合物ライブラリーから得られた小分子断片である。幾つかの場合では、化合物ライブラリーは、ＣｈｅｍＢｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、Ｐｙｒａｍｉｄ Ｐｌａｔｆｏｒｍ Ｆｒａｇｍｅｎｔ －Ｂａｓｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ断片ライブラリー、ＡｎａｌｙｔｉＣｏｎからのＦＲＧｘ、 ＡｎＣｏｒｅＸからのＴＣＩ－Ｆｌａｇ、ＡＳＩＮＥＸからのＢｉｏ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ ＲｉｖｅｒからのＢｉｏＦｏｃｕｓ ３Ｄ、Ｅｍｅｒａｌｄ ＢｉｏからのＦｒａｇｍｅｎｔｓ ｏｆ Ｌｉｆｅ（ＦＯＬ）、Ｅｎａｍｉｎｅ Ｆｒａｇｍｅｎｔライブラリー、ＩＯＴＡ Ｄｉｖｅｒｓｅ １５００、ＢＩＯＮＥＴ断片ライブラリー、ｉｆｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＯＴＡＶＡ断片ライブラリー、Ｐｒｅｓｔｗｉｃｋ断片ライブラリー、Ｓｅｌｃｉａ断片ライブラリー、ＴｉｍＴｅｃ断片ベースのライブラリー、Ｖｉｔａｓ－Ｍ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙからのＡｌｌｉｕｍ、またはＺｅｎｏｂｉａ断片ライブラリーを含む。

【０２４５】

幾つかの事例では、親和性ハンドルは、生体直交型の親和性ハンドルである。幾つかの場合では、親和性ハンドルは、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオ硫酸塩、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、またはイソシアネートの基を含む。幾つかの場合では、親和性ハンドルは、アルキンまたはアジドの基を含む。幾つかの事例では、親和性ハンドルはさらに、親和性リガンドに結合される。幾つかの事例では、親和性リガンドは、発色団、標識基、またはその組み合わせを含む。幾つかの場合では、発色団は、蛍光色素、非蛍光色素発色団、消光剤、吸収発色団、フルオロフォア、有機染料、無機染料、金属キレート、または蛍光酵素基質を含む。幾つかの場合では、標識基は、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分、ビーズ、樹脂、固体支持体、またはそれらの組み合わせである。幾つかの事例では、親和性ハンドル部分はさらに、発色団を含む。幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブは、図３に例示されるシステイン反応性プローブである。

【０２４６】

本明細書の他のところにさらに記載されるように、細胞または細胞集団は、ヒトまたはヒト以外の霊長類などのあらゆる哺乳動物から得られる。幾つかの実施形態では、細胞または細胞集団は、上皮細胞、結合組織細胞、ホルモン分泌細胞、神経細胞、骨格筋細胞、血液細胞、または免疫系細胞である。追加の実施形態では、細胞または細胞集団は、癌性であるか、または腫瘍部位から得られる。

【０２４７】
＜システイン相互作用部位を含むポリペプチド＞
本明細書にはさらに、本明細書に記載される方法によって特定されたシステイン相互作用部位の１つ以上を含むポリペプチドが開示される。幾つかの実施形態において、本明細書には、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する少なくとも９０％の配列同一性を含む、単離および精製されたポリペプチドが記載される。幾つかの実施形態では、単離および精製されたポリペプチドは、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する少なくとも９１％、９２％　９３％　９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。幾つかの実施形態では、単離および精製されたポリペプチドは、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する１００％の配列同一性を含む。幾つかの事例では、単離および精製されたポリペプチドは、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の全長に対する１００％の配列同一性を含む。幾つかの事例では、単離および精製されたポリペプチドは、長さが最大で５０のアミノ酸である。
【０２４８】
幾つかの実施形態において、本明細書にはさらに、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する少なくとも９０％の配列同一性を含むポリペプチドをコードする核酸が記載される。幾つかの実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸は、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。幾つかの実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸は、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の少なくとも７つの連続するアミノ酸に対する１００％の配列同一性を含む。幾つかの実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸は、表１－３または８－９から選択されるアミノ酸配列の全長に対する１００％の配列同一性を含む。
【０２４９】
幾つかの実施形態において、本明細書にはさらに、生物学的に活性なシステイン部位をタンパク質上にマッピングする方法が開示され、該方法は、サンプルからシステイン反応性プローブのタンパク質複合体のセットを収集する工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置付けられたシステイン残基との共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程；プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを解析する工程；および前の工程に基づいて、生物学的に活性なシステイン部位をタンパク質上にマッピングする工程を含む。
【０２５０】
幾つかの実施形態では、解析する工程はさらに、タンパク質断片のセットを生成するために、プロテアーゼでシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体のセットを処理する工程を含む。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、またはメタロプロテアーゼである。幾つかの事例では、プロテアーゼはセリンプロテアーゼである。幾つかの事例では、プロテアーゼはトリプシンである。幾つかの事例では、システイン反応性プローブのタンパク質複合体はさらに、ビオチン部分などの標識基に結合される。幾つかの事例では、ビオチン部分などの標識基はさらに、リンカーを含む。幾つかの事例では、リンカーはペプチドである。幾つかの事例では、ペプチドリンカーは、長さが約７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上のアミノ酸残基である。幾つかの事例では、ペプチドリンカーは切断部位を含む。切断部位の限定しないリストは、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）、トロンビン（Ｔｈｒ）、エンテロキナーゼ（ＥＫＴ）、活性化第Ｘ因子（Ｘａ）、またはヒトライノウイルス３Ｃプロテアーゼ（３Ｃ／ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ）を含む。幾つかの事例では、ペプチドリンカーは、ＴＥＶプロテアーゼ切断部位を含む。幾つかの事例では、ＴＥＶプロテア

ーゼ切断部位は、以下の配列：Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ａｓｎ－Ｇｌｕ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６０）を含む。幾つかの事例では、ビオチン部分はさらに、ビーズ（例えばストレプトアビジン結合ビーズ）に連結される。

【０２５１】

幾つかの事例では、（リンカーを含む及びストレプトアビジン結合ビーズに結合されたビオチン部分を介して）ビーズに結合されたシステイン反応性プローブ－タンパク質複合体からのタンパク質は、トリプシンで温浸され、固定化されたペプチドまたはタンパク質断片はさらに、分離され、収集される。幾つかの事例では、収集されたペプチドまたはタンパク質断片は、その後、プロテアーゼ（例えばＴＥＶプロテアーゼ）によって温浸され、処理されたタンパク質断片は、その後、分離され、解析のために収集される。幾つかの事例では、解析は、上に及び本明細書の他のところに記載されるようなプロテオミクス解析である。幾つかの事例では、タンパク質断片の配列がさらに決定される。幾つかの事例では、タンパク質断片は、システイン含有タンパク質上の小分子断片結合部位に相関する。

【０２５２】

幾つかの実施形態では、タンパク質断片の配列は、表１－３または８－９に例示されるような配列に相関する。幾つかの事例では、表１－３または８－９に示されるような配列は、薬物結合部位としての全長タンパク質上の部位に相関する。幾つかの事例では、表１－３または８－９に示されるような配列は、薬物結合部位に相関する。幾つかの事例では、表１－３または８－９に示されるような配列の１つ以上を含むポリペプチドは、小分子断片のスクリーニングのためのプローブとして働く。

【０２５３】

幾つかの事例では、ポリペプチドの生成後に、ポリペプチドは、不純物を除去するために精製工程の１以上のラウンドにさらされる。幾つかの事例では、精製工程は、親和性ベース、サイズ排除ベース、イオン交換ベースの方法などの分離方法を利用するクロマトグラフィー工程である。幾つかの場合では、ポリペプチドは、最大で３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、または１００％純粋であるか、あるいは不純物が存在しない。幾つかの場合では、ポリペプチドは、少なくとも３０％、４０％　５０％　６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、または１００％純粋でるか、あるいは不純物が存在しない。

【０２５４】

上に記載されるように、システイン含有タンパク質に由来するポリペプチドをコードする核酸は、不純物を除去するために精製工程の１以上のラウンドにさらされる。幾つかの事例では、精製工程は、親和性ベース、サイズ排除ベース、イオン交換ベースの方法などの分離方法を利用するクロマトグラフィー工程である。幾つかの場合では、核酸は、最大で３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、または１００％純粋であるか、あるいは不純物が存在しない。幾つかの場合では、核酸は、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、または１００％純粋であるか、あるいは不純物が存在しない。

【０２５５】

本明細書に使用されるように、ポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはその組み合わせを含む。幾つかの事例では、アミノ酸残基は、アミノ基およびカルボキシル基の両方を含有している分子を指す。適切なアミノ酸は、限定することなく、自然発生のアミノ酸のＤ－異性体およびＬ－異性体の両方の他に、有機合成または他の代謝経路によって調製された非自然発生のアミノ酸のＤ－異性体およびＬ－異性体の両方も含む。用語、アミノ酸は、本明細書で使用されるように、限定することなく、アミノ酸、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、およびアミノ酸アナログを含む。

【０２５６】

用語「α－アミノ酸」は、α－炭素と指定される炭素に結合されたアミノ基およびカルボキシル基の両方を含有している分子を指す。

【０２５７】
用語「β－アミノ酸」は、β構成でアミノ基およびカルボキシル基の両方を含有している分子を指す。
【０２５８】
「自然発生のアミノ酸」は、自然で合成されたペプチドにおいて一般に見られる、および１文字の略語Ａ、Ｒ、Ｎ、Ｃ、Ｄ、Ｑ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｆ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、ＹおよびＶによって知られている、２０のアミノ酸のいずれか１つを指す。
【０２５９】
以下の表は、天然アミノ酸の特性の概要を示す：
【０２６０】
【表１】

アミノ酸	３文字コード	１文字コード	側鎖極性	側鎖電荷 (pH 7.4)	ハイドロパシー指数
アラニン	Ala	A	無極性	中性	1.8
アルギニン	Arg	R	極性	正	−4.5
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	−3.5
アスパラギン酸	Asp	D	極性	負	−3.5
システイン	Cys	C	極性	中性	2.5
グルタミン酸	Glu	E	極性	負	−3.5
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	−3.5
グリシン	Gly	G	無極性	中性	−0.4
ヒスチジン	His	H	極性	正(10%) 中性(90%)	−3.2
イソロイシン	Ile	I	無極性	中性	4.5
ロイシン	Leu	L	無極性	中性	3.8
リシン	Lys	K	極性	正	−3.9
メチオニン	Met	M	無極性	中性	1.9
フェニルアラニン	Phe	F	無極性	中性	2.8
プロリン	Pro	P	無極性	中性	−1.6
セリン	Ser	S	極性	中性	−0.8
トレオニン	Thr	T	極性	中性	−0.7
トリプトファン	Trp	W	無極性	中性	−0.9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	−1.3
バリン	Val	V	無極性	中性	4.2

【０２６１】
「疎水性アミノ酸」は、小さな疎水性アミノ酸および大きな疎水性アミノ酸を含む。「小さな疎水性アミノ酸」は、グリシン、アラニン、プロリン、およびそれらのアナログである。「大きな疎水性アミノ酸」は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびそれらのアナログである。「極性アミノ酸」は

、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、チロシン、およびそれらのアナログである。「荷電アミノ酸」は、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、およびそれらのアナログである。幾つかの場合では、アスパラギン酸およびグルタミン酸は、酸性アミノ酸と呼ばれる。他の場合では、リシン、アルギニンおよびヒスチジンは、塩基性アミノ酸と呼ばれる。

【０２６２】

用語「アミノ酸アナログ」は、アミノ酸に構造的に類似している及びペプチド模倣大環状分子の形成においてアミノ酸に置換される分子を指す。アミノ酸アナログは、限定することなく、アミノ基またはカルボキシ基が、反応性が類似した基によって置換される（例えば、第一級アミンと第二級または第三級のアミンとの置換、またはカルボキシ基とエステルとの置換）β－アミノ酸およびアミノ酸を含む。

【０２６３】

用語「非天然アミノ酸」は、自然で合成されたペプチドにおいて一般に見られる、および１文字の略語Ａ、Ｒ、Ｎ、Ｃ、Ｄ、Ｑ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｆ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、ＹおよびＶによって知られている、２０のアミノ酸の１つではないアミノ酸を指す。

【０２６４】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、β－アミノ酸アナログを含む。β－アミノ酸アナログの例は、限定されないが、以下を含む：環状β－アミノ酸アナログ；β－アラニン；（Ｒ）－β－フェニルアラニン；（Ｒ）－１，２，３，４－テトラヒドロ－イソキノリン－３－酢酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（１－ナフチル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２，４－ジクロロフェニル）酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－クロロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－シアノフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－フルオロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－フラニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－メチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－ナフチル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－チエニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（２－トリフルオロメチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３，４－ジクロロフェニル）酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３，４－ジフルオロフェニル）酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－ベンゾチエニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－クロロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－シアノフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－フルオロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－メチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－ピリジル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－チエニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（３－トリフルオロメチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－ブロモフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－クロロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－シアノフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－フルオロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－ヨードフェニル－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－メチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－ニトロフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－ピリジル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－（４－トリフルオロメチルフェニル）－酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－４－ペンタフルオロ－フェニル酪酸；（Ｒ）－３－アミノ－５－ヘキセン酸；（Ｒ）－３－アミノ－５－ヘキシン酸；（Ｒ）－３－アミノ－５－フェニルペンタン酸；（Ｒ）－３－アミノ－６－フェニル－５－ヘキセン酸；（Ｓ）－１，２，３，４－テトラヒドロ－イソキノリン－３－酢酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（１－ナフチル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２，４－ジクロロフェニル）酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－クロロフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－シアノフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－フルオロフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－フラニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－メチルフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－ナフチル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－チエニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（２－トリフルオロメチルフェニル

）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３，４－ジクロロフェニル）酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３，４－ジフルオロフェニル）酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－ベンゾチエニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－クロロフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－シアノフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－フルオロフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－メチルフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－ピリジル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－チエニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（３－トリフルオロメチルフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－ブロモフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－クロロフェニル）酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－シアノフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－フルオロフェニル）酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－ヨードフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－メチルフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－ニトロフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－ピリジル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－（４－トリフルオロメチルフェニル）－酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－４－ペンタフルオロ－フェニル酪酸；（Ｓ）－３－アミノ－５－ヘキセン酸；（Ｓ）－３－アミノ－５－ヘキシン酸；（Ｓ）－３－アミノ－５－フェニルペンタン酸；（Ｓ）－３－アミノ－６－フェニル－５－ヘキセン酸；１，２，５，６－テトラヒドロピリジン－３－カルボン酸；１，２，５，６－テトラヒドロピリジン－４－カルボン酸；３－アミノ－３－（２－クロロフェニル）－プロピオン酸；３－アミノ－３－（２－チエニル）－プロピオン酸；３－アミノ－３－（３－ブロモフェニル）－プロピオン酸；３－アミノ－３－（４－クロロフェニル）－プロピオン酸；３－アミノ－３－（４－メトキシフェニル）－プロピオン酸；３－アミノ－４，４，４－トリフルオロ－酪酸；３－アミノアジビン酸；Ｄ－β－フェニルアラニン；β－ロイシン；Ｌ－β－ホモアラニン；Ｌ－β－ホモアスパラギン酸γ－ベンジルエステル；Ｌ－β－ホモグルタミン酸δ－ベンジルエステル；Ｌ－β－ホモイソロイシン；Ｌ－β－ホモロイシン；Ｌ－β－ホモメチオニン；Ｌ－β－ホモフェニルアラニン；Ｌ－β－ホモプロリン；Ｌ－β－ホモトリプトファン；Ｌ－β－ホモバリン；Ｌ－Ｎω－ベンジルオキシカルボニル－β－ホモリシン；Ｎω－Ｌ－β－ホモアルギニン；Ｏ－ベンジル－Ｌ－β－ホモヒドロキシプロリン；Ｏ－ベンジル－Ｌ－β－ホモセリン；Ｏ－ベンジル－Ｌ－β－ホモトレオニン；Ｏ－ベンジル－Ｌ－β－ホモチロシン；Ｙ－トリチル－Ｌ－β－ホモアスパラギン；（Ｒ）－β－フェニルアラニン；Ｌ－β－ホモアスパラギン酸γ－ｔ－ブチルエステル；Ｌ－β－ホモグルタミン酸δ－ｔ－ブチルエステル；Ｌ－Ｎω－β－ホモリシン；Ｎδ－トリチル－Ｌ－β－ホモグルタミン；Ｎω－２，２，４，６，７－ペンタメチル－ジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル－Ｌ－β－ホモアルギニン；Ｏ－ｔ－ブチル－Ｌ－β－ホモヒドロキシ－プロリン；Ｏ－ｔ－ブチル－Ｌ－β－ホモセリン；Ｏ－ｔ－ブチル－Ｌ－β－ホモトレオニン；Ｏ－ｔ－ブチル－Ｌ－β－ホモチロシン；２－アミノシクロペンタンカルボン酸；および２－アミノシクロヘキサンカルボン酸。

【０２６５】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、アラニン、バリン、グリシンまたはロイシンアラニン、バリン、グリシンおよびロイシンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、以下を含む：α－メトキシグリシン；α－アリル－Ｌ－アラニン；α－アミノイソ酪酸；α－メチル－ロイシン；β－（１－ナフチル）－Ｄ－アラニン；β－（１－ナフチル）－Ｌ－アラニン；β－（２－ナフチル）－Ｄ－アラニン；β－（２－ナフチル）－Ｌ－アラニン；β－（２－ピリジル）－Ｄ－アラニン；β－（２－ピリジル）－Ｌ－アラニン；β－（２－チエニル）－Ｄ－アラニン；β－（２－チエニル）－Ｌ－アラニン；β－（３－ベンゾチエニル）－Ｄ－アラニン；β－（３－ベンゾチエニル）－Ｌ－アラニン；β－（３－ピリジル）－Ｄ－アラニン；β－（３－ピリジル）－Ｌ－アラニン；β－（４－ピリジル）－Ｄ－アラニン；β－（４－ピリジル）－Ｌ－アラニン；β－クロロ－Ｌ－アラニン；β－シアノ－Ｌ－アラニン；β－シクロヘキシル－Ｄ－アラニン；β－シクロヘキシル－Ｌ－アラニン；β－シクロペンテン－１－イル－アラニン；β－シクロペンチル－アラニン；β－シクロプロピル－Ｌ－Ａｌａ－ＯＨ．ジシクロヘキシルアンモニウム塩；

β－ｔ－ブチル－Ｄ－アラニン；β－ｔ－ブチル－Ｌ－アラニン；γ－アミノ酪酸；Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；２，４－ジニトロ－フェニルグリシン；２，５－ジヒドロ－Ｄ－フェニルグリシン；２－アミノ－４，４，４－トリフルオロ酪酸；２－フルオロ－フェニルグリシン；３－アミノ－４，４，４－トリフルオロ－酪酸；３－フルオロ－バリン；４，４，４－トリフルオロ－バリン；４，５－デヒドロ－Ｌ－ｌｅｕ－ＯＨ．ジシクロヘキシルアンモニウム塩；４－フルオロ－Ｄ－フェニルグリシン；４－フルオロ－Ｌ－フェニルグリシン；４－ヒドロキシ－Ｄ－フェニルグリシン；５，５，５－トリフルオロ－ロイシン；６－アミノヘキサン酸；シクロペンチル－Ｄ－Ｇｌｙ－ＯＨ．ジシクロヘキシルアンモニウム塩；シクロペンチル－Ｇｌｙ－ＯＨ．ジシクロヘキシルアンモニウム塩；Ｄ－α，β－ジアミノプロピオン酸；Ｄ－α－アミノ酪酸；Ｄ－α－ｔ－ブチルグリシン；Ｄ－（２－チエニル）グリシン；Ｄ－（３－チエニル）グリシン；Ｄ－２－アミノカプロン酸；Ｄ－２－インダニルグリシン；Ｄ－アリルグリシン－ジシクロヘキシルアンモニウム塩；Ｄ－シクロヘキシルグリシン；Ｄ－ノルバリン；Ｄ－フェニルグリシン；β－アミノ酪酸；β－アミノイソ酪酸；（２－ブロモフェニル）グリシン；（２－メトキシフェニル）グリシン；（２－メチルフェニル）グリシン；（２－チアゾリル）グリシン；（２－チエニル）グリシン；２－アミノ－３－（ジメチルアミノ）－プロピオン酸；Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；Ｌ－α－アミノ酪酸；Ｌ－α－ｔ－ブチルグリシン；Ｌ－（３－チエニル）グリシン；Ｌ－２－アミノ－３－（ジメチルアミノ）－プロピオン酸；Ｌ－２－アミノカプロン酸ジシクロヘキシル－アンモニウム塩；Ｌ－２－インダニルグリシン；Ｌ－アリルグリシン．ジシクロヘキシルアンモニウム塩；Ｌ－ジシクロヘキシルグリシン；Ｌ－フェニルグリシン；Ｌ－プロパルギルグリシン；Ｌ－ノルバリン；Ｎ－α－アミノメチル－Ｌ－アラニン；Ｄ－α，γ－ジアミノ酪酸；Ｌ－α－ジアミノ酪酸；β－シクロプロピル－Ｌ－アラニン；（Ｎ－β－（２，４－ジニトロフェニル））－Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；（Ｎ－β－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｄ－α，β－ジアミノプロピオン酸；（Ｎ－β－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；（Ｎ－β－４－メチルトリチル）－Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；（Ｎ－β－アリルオキシカルボニル）－Ｌ－α，β－ジアミノプロピオン酸；（Ｎ－γ－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｄ－α，γ－ジアミノ酪酸；（Ｎ－γ－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｌ－α，γ－ジアミノ酪酸；（Ｎ－γ－４－メチルトリチル）－Ｄ－α，γ－ジアミノ酪酸；（Ｎ－γ－４－メチルトリチル）－Ｌ－α，γ－ジアミノ酪酸；（Ｎ－γ－アリルオキシカルボニル）－Ｌ－α，γ－ジアミノ酪酸；Ｄ－α，γ－ジアミノ酪酸；４，５－デヒドロ－Ｌ－ロイシン；シクロペンチル－Ｄ－Ｇｌｙ－ＯＨ；シクロペンチル－Ｇｌｙ－ＯＨ；Ｄ－アリルグリシン；Ｄ－ホモシクロヘキシルアラニン；Ｌ－１－ピレニルアラニン；Ｌ－２－アミノカプロン酸；Ｌ－アリルグリシン；Ｌ－ホモシクロヘキシルアラニン；およびＮ－（２－ヒドロキシ－４－メトキシ－Ｂｚｌ）－Ｇｌｙ－ＯＨ。

【０２６６】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、アルギニンまたはリシンのアナログを含む。アルギニンおよびリシンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、以下を含む：シトルリン；Ｌ－２－アミノ－３－グアニジノプロピオン酸；Ｌ－２－アミノ－３－ウレイドプロピオン酸；Ｌ－シトルリン；Ｌｙｓ（Ｍｅ）$_2$－ＯＨ；Ｌｙｓ（Ｎ$_3$）－ＯＨ；Ｎδ－ベンジルオキシカルボニル－Ｌ－オルニチン；Ｎω－ニトロ－Ｄ－アルギニン；Ｎω－ニトロ－Ｌ－アルギニン；α－メチル－オルニチン；２，６－ジアミノヘプタン二酸；Ｌ－オルニチン；（Ｎδ－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソ－シクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｄ－オルニチン；（Ｎδ－１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソ－シクロヘキサ－１－イリデン）エチル）－Ｌ－オルニチン；（Ｎδ－４－メチルトリチル）－Ｄ－オルニチン；（Ｎδ－４－メチルトリチル）－Ｌ－オルニチン；Ｄ－オルニチン；Ｌ－オルニチン；Ａｒｇ（Ｍｅ）（Ｐｂｆ）－ＯＨ；Ａｒｇ（Ｍｅ）$_2$－ＯＨ

（非対称的）；Ａｒｇ（Ｍｅ）$_2$－ＯＨ（対称的）；Ｌｙｓ（ｉｖＤｄｅ）－ＯＨ；Ｌｙｓ（Ｍｅ）$_2$－ＯＨ．ＨＣｌ；Ｌｙｓ（Ｍｅ３）－ＯＨクロリド；Ｎω－ニトロ－Ｄ－アルギニン；およびＮω－ニトロ－Ｌ－アルギニン。

【０２６７】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、アスパラギン酸またはグルタミン酸のアナログを含む。アスパラギン酸およびグルタミン酸のアミノ酸アナログの例は、限定されないが、以下を含む：α－メチル－Ｄ－アスパラギン酸；α－メチル－グルタミン酸；α－メチル－Ｌ－アスパラギン酸；γ－メチレン－グルタミン酸；（Ｎ－γ－エチル）－Ｌ－グルタミン；［Ｎ－α－（４－アミノベンゾイル）］－Ｌ－グルタミン酸；２，６－ジアミノピメリン酸；Ｌ－α－アミノスベリン酸；Ｄ－２－アミノアジピン酸；Ｄ－α－アミノスベリン酸；α－アミノピメリン酸；イミノ二酢酸；Ｌ－２－アミノアジピン酸；トレオ－β－メチル－アスパラギン酸；γ－カルボキシ－Ｄ－グルタミン酸γ，γ－ジ－ｔ－ブチルエステル；γ－カルボキシ－Ｌ－グルタミン酸γ，γ－ジ－ｔ－ブチルエステル；Ｇｌｕ（ＯＡｌｌ）－ＯＨ；Ｌ－Ａｓｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ；およびピログルタミン酸。

【０２６８】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、システインおよびメチオニンのアナログを含む。システインおよびメチオニンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、Ｃｙｓ（ファルネシル）－ＯＨ、Ｃｙｓ（ファルネシル）－ＯＭｅ、α－メチル－メチオニン、Ｃｙｓ（２－ヒドロキシエチル）－ＯＨ、Ｃｙｓ（３－アミノプロピル）－ＯＨ、２－アミノ－４－（エチルチオ）酪酸、ブチオニン、ブチオニンスルホキシイミン、エチオニン、メチオニンメチルスルホニウムクロリド、セレノメチオニン、システイン酸、［２－（４－ピリジル）エチル］－ＤＬ－ペニシラミン、［２－（４－ピリジル）エチル］－Ｌ－システイン、４－メトキシベンジル－Ｄ－ペニシラミン、４－メトキシベンジル－Ｌ－ペニシラミン、４－メチルベンジル－Ｄ－ペニシラミン、４－メチルベンジル－Ｌ－ペニシラミン、ベンジル－Ｄ－システイン、ベンジル－Ｌ－システイン、ベンジル－ＤＬ－ホモシステイン、カルバモイル－Ｌ－システイン、カルボキシエチル－Ｌ－システイン、カルボキシメチル－Ｌ－システイン、ジフェニルメチル－Ｌ－システイン、エチル－Ｌ－システイン、メチル－Ｌ－システイン、ｔ－ブチル－Ｄ－システイン、トリチル－Ｌ－ホモシステイン、トリチル－Ｄ－ペニシラミン、シスタチオニン、ホモシスチン、Ｌ－ホモシスチン、（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン、セレノ－Ｌ－シスチン、シスタチオニン、Ｃｙｓ（ＳｔＢｕ）－ＯＨ、およびアセトアミドメチル－Ｄ－ペニシラミンを含む。

【０２６９】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、フェニルアラニンおよびチロシンのアナログを含む。フェニルアラニンおよびチロシンのアミノ酸アナログの例は、β－メチル－フェニルアラニン、β－ヒドロキシフェニルアラニン、α－メチル－３－メトキシ－ＤＬ－フェニルアラニン、α－メチル－Ｄ－フェニルアラニン、α－メチル－Ｌ－フェニルアラニン、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸、２，４－ジクロロ－フェニルアラニン、２－（トリフルオロメチル）－Ｄ－フェニルアラニン、２－（トリフルオロメチル）－Ｌ－フェニルアラニン、２－ブロモ－Ｄ－フェニルアラニン、２－ブロモ－Ｌ－フェニルアラニン、２－クロロ－Ｄ－フェニルアラニン、２－クロロ－Ｌ－フェニルアラニン、２－シアノ－Ｄ－フェニルアラニン、２－シアノ－Ｌ－フェニルアラニン、２－フルオロ－Ｄ－フェニルアラニン、２－フルオロ－Ｌ－フェニルアラニン、２－メチル－Ｄ－フェニルアラニン、２－メチル－Ｌ－フェニルアラニン、２－ニトロ－Ｄ－フェニルアラニン、２－ニトロ－Ｌ－フェニルアラニン、２，４，５－トリヒドロキシ－フェニルアラニン、３，４，５－トリフルオロ－Ｄ－フェニルアラニン、３，４，５－トリフルオロ－Ｌ－フェニルアラニン、３，４－ジクロロ－Ｄ－フェニルアラニン、３，４－ジクロロ－Ｌ－フェニルアラニン、３，４－ジフルオロ－Ｄ－フェニルアラニン、３，４－ジフルオロ－Ｌ－フェニルアラニン、３，４－ジヒドロキシ－Ｌ－フェニルアラニン、３，４－ジメトキシ－Ｌ－フェニルアラニン、３，５，３’－トリヨード－Ｌ－チロニン、３，５－ジヨード－Ｄ－チロシン、３，５－ジヨード－Ｌ－チロシン、３，５－ジヨー

ド－Ｌ－チロニン、３－（トリフルオロメチル）－Ｄ－フェニルアラニン、３－（トリフルオロメチル）－Ｌ－フェニルアラニン、３－アミノ－Ｌ－チロシン、３－ブロモ－Ｄ－フェニルアラニン、３－ブロモ－Ｌ－フェニルアラニン、３－クロロ－Ｄ－フェニルアラニン、３－クロロ－Ｌ－フェニルアラニン、３－クロロ－Ｌ－チロシン、３－シアノ－Ｄ－フェニルアラニン、３－シアノ－Ｌ－フェニルアラニン、３－フルオロ－Ｄ－フェニルアラニン、３－フルオロ－Ｌ－フェニルアラニン、３－フルオロ－チロシン、３－ヨード－Ｄ－フェニルアラニン、３－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、３－ヨード－Ｌ－チロシン、３－メトキシ－Ｌ－チロシン、３－メチル－Ｄ－フェニルアラニン、３－メチル－Ｌ－フェニルアラニン、３－ニトロ－Ｄ－フェニルアラニン、３－ニトロ－Ｌ－フェニルアラニン、３－ニトロ－Ｌ－チロシン、４－（トリフルオロメチル）－Ｄ－フェニルアラニン、４－（トリフルオロメチル）－Ｌ－フェニルアラニン、４－アミノ－Ｄ－フェニルアラニン、４－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、４－ベンゾイル－Ｄ－フェニルアラニン、４－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、４－ビス（２－クロロエチル）アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、４－ブロモ－Ｄ－フェニルアラニン、４－ブロモ－Ｌ－フェニルアラニン、４－クロロ－Ｄ－フェニルアラニン、４－クロロ－Ｌ－フェニルアラニン、４－シアノ－Ｄ－フェニルアラニン、４－シアノ－Ｌ－フェニルアラニン、４－フルオロ－Ｄ－フェニルアラニン、４－フルオロ－Ｌ－フェニルアラニン、４－ヨード－Ｄ－フェニルアラニン、４－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、チロキシン、３，３－ジフェニルアラニン、チロニン、エチル－チロシン、およびメチル－チロシンを含む。

【０２７０】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、プロリンのアナログを含む。プロリンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、３，４－デヒドロ－プロリン、４－フルオロ－プロリン、シス－４－ヒドロキシ－プロリン、チアゾリジン－２－カルボン酸、およびトランス－４－フルオロ－プロリンを含む。

【０２７１】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、セリンおよびトレオニンのアナログを含む。セリンおよびトレオニンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、３－アミノ－２－ヒドロキシ－５－メチルヘキサン酸、２－アミノ－３－ヒドロキシ－４－メチルペンタン酸、２－アミノ－３－エトキシブタン酸、２－アミノ－３－メトキシブタン酸、４－アミノ－３－ヒドロキシ－６－メチルヘプタン酸、２－アミノ－３－ベンジルオキシプロピオン酸、２－アミノ－３－ベンジルオキシプロピオン酸、２－アミノ－３－エトキシプロピオン酸、４－アミノ－３－ヒドロキシブタン酸、およびα－メチルセリンを含む。

【０２７２】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、トリプトファンのアナログを含む。トリプトファンのアミノ酸アナログの例は、限定されないが、以下を含む：α－メチル－トリプトファン；β－（３－ベンゾチエニル）－Ｄ－アラニン；β－（３－ベンゾチエニル）－Ｌ－アラニン；１－メチル－トリプトファン；４－メチル－トリプトファン；５－ベンジルオキシ－トリプトファン；５－ブロモ－トリプトファン；５－クロロ－トリプトファン；５－フルオロ－トリプトファン；５－ヒドロキシ－トリプトファン；５－ヒドロキシ－Ｌ－トリプトファン；５－メトキシ－トリプトファン；５－メトキシ－Ｌ－トリプトファン；５－メチル－トリプトファン；６－ブロモ－トリプトファン；６－クロロ－Ｄ－トリプトファン；６－クロロ－トリプトファン；６－フルオロ－トリプトファン；６－メチル－トリプトファン；７－ベンジルオキシ－トリプトファン；７－ブロモ－トリプトファン；７－メチル－トリプトファン；Ｄ－１，２，３，４－テトラヒドロ－ノルハルマン－３－カルボン酸；６－メトキシ－１，２，３，４－テトラヒドロノルハルマン－１－カルボン酸；７－アザトリプトファンアミド；Ｌ－１，２，３，４－テトラヒドロ－ノルハルマン－３－カルボン酸；５－メトキシ－２－メチル－トリプトファン；および６－クロロ－Ｌ－トリプトファン。

【０２７３】

幾つかの事例では、アミノ酸アナログはラセミ化合物である。幾つかの事例では、アミ

ノ酸アナログのＤ異性体が使用される。幾つかの場合では、アミノ酸アナログのＬ異性体が使用される。幾つかの事例では、アミノ酸アナログは、ＲまたはＳの構成であるキラル中心を含む。時に、β－アミノ酸アナログのアミノ基は、保護基、例えば、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル（ＢＯＣ基）、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（ＦＭＯＣ）、トシルなどで置換される。時に、β－アミノ酸アナログのカルボン酸官能基は、例えば、そのエステル誘導体として保護される。幾つかの場合では、アミノ酸アナログの塩が使用される。

【０２７４】

幾つかの実施形態では、核酸分子は、一緒に共有結合された少なくとも２つのヌクレオチドを指す。幾つかの事例では、本明細書に記載される核酸は、リン酸ジエステル結合を含有するが、幾つかの場合では、下に概説されるように（例えば、標識プローブなどのプライマーおよびプローブの構築において）、交互の骨格を有する核酸アナログが含まれ、これは、例えば、ホスホルアミド（Ｂｅａｕｃａｇｅ ｅｔ ａｌ．, Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ４９（１０）：１９２５（１９９３）およびその参考文献；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ, Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．３５：３８００（１９７０）, Ｓｐｒｉｎｚｌ ｅｔ ａｌ．, Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．８１：５７９（１９７７）；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．, Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：３４８７（１９８６）；Ｓａｗａｉ ｅｔ ａｌ, Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．８０５（１９８４）, Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１０：４４７０（１９８８）；およびＰａｕｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ, Ｃｈｅｍｉｃａ Ｓｃｒｉｐｔａ ２６：１４１ ９１９８６）、ホスホロチオエート（Ｍａｇ ｅｔ ａｌ, Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：１４３７（１９９１）；米国特許出願第５，６４４，０４８号）、ジチオリン酸（Ｂｒｉｕ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ａｍ, Ｃｈｅｍ, Ｓｏｃ．１１１：２３２１（１９８９））、Ｏ－メチルホスホロアミダイト連鎖（Ｅｃｋｓｔｅｉｎ, Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ, Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓを参照）、およびペプチド核酸（本明細書で「ＰＮＡ」とも呼ばれる）骨格および連鎖（Ｅｇｈｏｌｍ, Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：１８９５（１９９２）；Ｍｅｉｅｒ ｅｔ ａｌ, Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３１：１００８（１９９２）；Ｎｉｅｌｓｅｎ, Ｎａｔｕｒｅ, ３６５：５６６（１９９３）；Ｃａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ ３８０：２０７（１９９６）を参照し、それらすべては引用によって組み込まれる）を含む。他のアナログ核酸は、ロックド核酸（本明細書で「ＬＮＡ」とも呼ばれる）（ｋｏｓｈｋｉｎ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２０．１３２５２ ３（１９９８））；正の骨格（Ｄｅｎｐｃｙ ｅｔ ａｌ．, Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：６０９７（１９９５））；非イオン性の骨格（米国特許出願第５，３８６，０２３号、第５，６３７，６８４号、第５，６０２，２４０号、第５，２１６，１４１号および第４，４６９，８６３号；Ｋｉｅｄｒｏｗｓｈｉ ｅｔ ａｌ．, Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌｉｓｈ ３０：４２３（１９９１）；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１０：４４７０（１９８８）；Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．. Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ & Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ １３：１５９７（１９９４）；Ｃｈａｐｔｅｒｓ ２ ａｎｄ ３, ＡＳＣ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ５８０, "Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ", Ｅｄ．Ｙ．Ｓ．Ｓａｎｇｈｕｉ ａｎｄ Ｐ．Ｄａｎ Ｃｏｏｋ；Ｍｅｓｍａｅｋｅｒ ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．４：３９５（１９９４）；Ｊｅｆｆｓ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕ!ａｒ ＮＭＲ ３４：１７（１９９４）；Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３７：７４３（１９９６））、および米国特許出願第５，２３５，０３３号および第５，０３４，５０６号、およびＣｈａｐｔｅｒｓ ６ ａｎｄ ７, ＡＳＣ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ５８０,“Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄ

ｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ”, Ｅｄ. Ｙ. Ｓ. Ｓａｎｇｈｕｉ ａｎｄ Ｐ. Ｄａｎ Ｃｏｏｋに記載されるものを含む非リボース骨格、を含む二環式構造を有する核酸を含む。１つ以上の炭素環式糖を含有している核酸も、核酸の定義内に含まれる（Ｊｅｎｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ., Ｃｈｅｍ. Ｓｏｃ. Ｒｅｖ.（１９９５）ｐｐ １６９ １７６を参照）。幾つかの核酸アナログは、Ｒａｗｌｓ, Ｃ＆Ｅ Ｎｅｗｓ Ｊｉｍ. ２, １９９７ ｐａｇｅ ３５に記載されている。「ロックド核酸」も、核酸アナログの定義内に含まれる。ＬＮＡは、リボース環は、２’－Ｏ原子を４’－Ｃ原子に結合するメチレン架橋によって「ロックされる（ｌｏｃｋｅｄ）」, 核酸アナログのクラスである。これらの参考文献はすべて、引用によって本明細書に明確に組み込まれる。幾つかの事例では、リボースリン酸骨格のこれらの修飾は、生理的環境におけるそのような分子の安定性および半減期を増大するために行われる。例えば、ＰＮＡ：ＤＮＡおよびＬＮＡ－ＤＮＡハイブリッドは、より高い安定性を示し、それ故、幾つかの実施形態において使用される。標的核酸は、指定されるように、一本鎖または二本鎖であるか、あるいは一本鎖または二本鎖両方の配列の部分を含有している。用途によって、核酸は、ＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、およびｃＤＮＡを含む）、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡおよびｒＲＮＡを含む）またはハイブリッドであり、ここで核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドのあらゆる組み合わせ、およびウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キササニン（ｘａｔｈａｎｉｎｅ、ヒポキササニン（ｈｙｐｏｘａｔｈａｎｉｎｅ）、イソシトシン、イソグアニンなどを含む、塩基のあらゆる組み合わせを含有している。

【０２７５】

＜サンプル、解析技術、および器具使用＞

特定の実施形態では、本明細書に開示される方法の１つ以上は、サンプルを含む。幾つかの実施形態では、サンプルは、細胞サンプルまたは組織サンプルである。幾つかの事例では、サンプルは細胞サンプルである。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法との使用のためのサンプルは、動物の細胞から得られる。幾つかの事例では、動物細胞は、海洋無脊椎動物、魚、昆虫、両生類、爬虫類、または哺乳動物からの細胞を含む。幾つかの事例では、哺乳動物細胞は、霊長類、類人猿、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類の細胞である。幾つかの事例では、哺乳動物は、霊長類、類人猿、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレットなどである。幾つかの場合では、げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ハムスター、チンチラ、またはモルモットである。幾つかの実施形態では、鳥細胞は、カナリア、インコまたはオウム由来である。幾つかの実施形態では、爬虫類細胞は、カメ、トカゲまたはヘビ由来である。幾つかの場合では、魚細胞は熱帯魚由来である。幾つかの場合では、魚細胞はゼブラフィッシュ（例えばＤａｎｉｎｏ ｒｅｒｉｏ）由来である。幾つかの場合では、蠕虫細胞は線虫（例えばＣ. ｅｌｅｇａｎｓ）由来である。幾つかの場合では、両生類細胞はカエル由来である。幾つかの実施形態では、節足動物細胞は，タランチュラまたはヤドカリ由来である。

【０２７６】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法との使用のためのサンプルは、哺乳動物細胞から得られる。幾つかの事例では、哺乳動物細胞は、上皮細胞、結合組織細胞、ホルモン分泌細胞、神経細胞、骨格筋細胞、血液細胞、または免疫系細胞である。

【０２７７】

典型的な哺乳動物細胞は、限定されないが、２９３Ａ細胞株、２９３ＦＴ細胞株、２９３Ｆ細胞、２９３Ｈ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＣＨＯ ＤＧ４４細胞、ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＣＨＯ－Ｋ１細胞、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）Ｔ－ＲＥｘ（商標）２９３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－２９３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）３Ｔ３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＢＨＫ細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＣＨＯ細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＣＶ－１細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－Ｊｕｒｋａｔ細胞株、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３－Ｆ細胞、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＧｒｉｐＴｉｔｅ（商標）２９３ＭＳＲ細胞株、ＧＳ－ＣＨＯ細胞株、ＨｅｐａＲ

Ｇ（商標）細胞、Ｔ－ＲＥｘ（商標）　Ｊｕｒｋａｔ細胞株、Ｐｅｒ．Ｃ６細胞、Ｔ－ＲＥｘ（商標）－２９３細胞株、Ｔ－ＲＥｘ（商標）－ＣＨＯ細胞株、Ｔ－ＲＥｘ（商標）－ＨｅＬａ細胞株、ＮＣ－ＨＥＶＩＴ細胞株、およびＰＣ１２細胞株を含む。

【０２７８】

幾つかの事例では、本明細書に記載される方法との使用のためのサンプルは、腫瘍細胞株の細胞から得られる。幾つかの事例では、サンプルは、固形腫瘍細胞株の細胞から得られる。幾つかの事例では、固形腫瘍細胞株は肉腫細胞株である。幾つかの事例では、固形腫瘍細胞株は癌細胞株である。幾つかの実施形態では、肉腫細胞株は、胞巣状横紋筋肉腫、胞状軟部肉種、エナメル上皮腫、血管肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、軟繊維の明細胞肉腫、脱分化型脂肪肉腫、デスモイド、線維形成性小円形細胞腫瘍、胎児性横紋筋肉腫、類上皮線維肉腫、類上皮性血管内皮腫、類上皮肉腫、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、腎外ラブドイド腫瘍、骨外性粘液型軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、巨細胞腫の細胞株、血管周囲細胞腫、乳児線維肉腫、炎症性筋線維芽腫瘍、カポジ肉腫、骨の平滑筋肉腫、脂肪肉腫、骨の脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫（ＭＦＨ）、骨の悪性線維性組織球腫（ＭＦＨ）、悪性間葉腫、悪性末梢神経鞘腫、間葉性軟骨肉腫、粘液線維肉腫、粘液性脂肪肉腫、粘液炎症性線維芽肉腫（ｍｙｘｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｉｃ　ｓａｒｃｏｍａ）、血管周囲類上皮細胞分化を有する新生物（複数）、骨肉腫、傍骨性骨肉腫、血管周囲類上皮細胞分化を有する新生物、骨膜性骨肉腫、多形性脂肪肉腫、多形性横紋筋肉腫、ＰＮＥＴ／骨外性ユーイング腫瘍、横紋筋肉腫、円形細胞脂肪肉腫、小細胞骨肉腫、単発性線維性腫瘍、滑膜肉腫、血管拡張性骨肉腫から得られる。

【０２７９】

幾つかの実施形態では、癌細胞株は、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、未分化癌、大細胞癌、小細胞癌、肛門癌、虫垂癌、胆管癌（即ち、肝内胆管癌）、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、原発不明癌（ＣＵＰ）、食道癌、眼癌、ファロピウス管癌の細胞株、消化器癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、髄芽腫、黒色腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、副甲状腺疾患、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、睾丸癌、喉頭癌、甲状腺癌、子宮癌、膣癌または外陰癌から得られる。

【０２８０】

幾つかの事例では、サンプルは、血液悪性細胞株の細胞から得られる。幾つかの事例では、血液悪性細胞株はＴ細胞細胞株である。幾つかの事例では、血液悪性細胞株はＢ細胞細胞株である。幾つかの事例では、血液悪性細胞株は、非特定型末梢Ｔ細胞リンパ腫（ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ　ｎｏｔ　ｏｔｈｅｒｗｉｓｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｅｄ）（ＰＴＣＬ－ＮＯＳ）、未分化大細胞リンパ腫、血液免疫芽細胞リンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫（ＡＴＬＬ）、芽球性ＮＫ細胞リンパ腫、腸症型Ｔ細胞リンパ腫、肝脾（ｈｅｍａｔｏｓｐｌｅｎｉｃ）ガンマーデルタＴ細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、鼻ＮＫ／Ｔ細胞リンパ腫、または治療関連Ｔ細胞リンパ腫のＴ細胞細胞株から得られる。

【０２８１】

幾つかの事例では、血液悪性細胞株は、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、慢性リンパ球白血病（ＣＬＬ）、高リスクの慢性リンパ球白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、高リスクの小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、縦隔原発Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＬ）、免疫芽細胞性大細胞型リンパ腫、前駆Ｂリンパ芽球性リンパ腫、Ｂ細胞性前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、血管内大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、原発性体液性リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症のＢ細胞細胞株から得られる。

【０２８２】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法との使用のためのサンプルは、腫瘍細胞株から得られる。典型的な腫瘍細胞株は、限定されないが、６００ＭＰＥ、ＡＵ５６５、ＢＴ－２０、ＢＴ－４７４、ＢＴ－４８３、ＢＴ－５４９、Ｅｖｓａ－Ｔ、Ｈｓ５７８Ｔ、ＭＣＦ－７、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＳｋＢｒ３、Ｔ－４７Ｄ、ＨｅＬａ、ＤＵ１４５、ＰＣ３、ＬＮＣａＰ、Ａ５４９、Ｈ１２９９、ＮＣＩ－Ｈ４６０、Ａ２７８０、ＳＫＯＶ－３／Ｌｕｃ、Ｎｅｕｒｏ２ａ、ＲＫＯ、ＲＫＯ－ＡＳ４５－１、ＨＴ－２９、ＳＷ１４１７、ＳＷ９４８、ＤＬＤ－１、ＳＷ４８０、Ｃａｐａｎ－１、ＭＣ／９、Ｂ７２．３、Ｂ２５．２、Ｂ６．２、Ｂ３８．１、ＤＭＳ１５３、ＳＵ．８６．８６、ＳＮＵ－１８２、ＳＮＵ－４２３、ＳＮＵ－４４９、ＳＮＵ－４７５、ＳＮＵ－３８７、Ｈｓ８１７．Ｔ、ＬＭＨ、ＬＭＨ／２Ａ、ＳＮＵ－３９８、ＰＬＨＣ－１、ＨｅｐＧ２／ＳＦ、ＯＣＩ－Ｌｙ１、ＯＣＩ－Ｌｙ２、ＯＣＩ－Ｌｙ３、ＯＣＩ－Ｌｙ４、ＯＣＩ－Ｌｙ６、ＯＣＩ－Ｌｙ７、ＯＣＩ－Ｌｙ１０、ＯＣＩ－Ｌｙ１８、ＯＣＩ－Ｌｙ１９、Ｕ２９３２、ＤＢ、ＨＢＬ－１、ＲＩＶＡ、ＳＵＤＨＬ２、ＴＭＤ８、ＭＥＣ１、ＭＥＣ２、８Ｅ５、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ－３、ＴＡＬＬ－１０４、ＡＭＬ－１９３、ＴＨＰ－１、ＢＤＣＭ、ＨＬ－６０、Ｊｕｒｋａｔ、ＲＰＭＩ８２２６、ＭＯＬＴ－４、ＲＳ４、Ｋ－５６２、ＫＡＳＵＭＩ－１、Ｄａｕｄｉ、ＧＡ－１０、Ｒａｊｉ、ＪｅＫｏ－１、Ｋ－９２、およびＭｉｎｏを含む。

【０２８３】

幾つかの実施形態では、方法に使用されるサンプルは、個体からの組織または流体からのものである。サンプルは、限定されないが、組織（例えば、結合組織、筋組織、神経組織、または上皮組織）、全血、解離した骨髄、骨髄穿刺液、胸膜液、腹腔液、中枢髄液、腹液（ａｂｄｏｍｉｎａｌ　ｆｌｕｉｄ）、膵液、脳脊髄液、脳液、腹水、心膜液、尿、唾液、気管支洗浄液、汗、涙、耳流体（ｅａｒ　ｆｌｏｗ）、痰、陰嚢水腫液、精液、膣液、ミルク、羊水、および呼吸器、腸管、または尿生殖路の分泌物を含む。幾つかの実施形態では、サンプルは、生検から得られたサンプルまたは腫瘍組織サンプルなどの組織サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプルは血清サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプルは、１つ以上の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含有している血液細胞サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプルは、１つ以上の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を含有している。幾つかの実施形態では、サンプルは、１つ以上の播種性腫瘍細胞（例えば、骨髄穿刺液サンプルにおけるＤＴＣ）を含有している。

【０２８４】

幾つかの実施形態では、サンプルは、周知の及び通例の臨床法を使用してサンプルを得る適切な手段によって個体から得られる。個体から組織サンプルを得るための手順は周知である。例えば、針吸引生検などから組織サンプルを収集および処理するための手順は、周知であり、提供される方法における使用のためのサンプルを得るために利用される。典型的に、そのような組織サンプルの収集のために、細い中空針が、細胞のサンプリングのために腫瘤などの瘤へと挿入され、染色後に、顕微鏡で検査される。

【０２８５】

＜サンプルの調製および解析＞

幾つかの実施形態では、サンプルはサンプル溶液である。幾つかの事例では、サンプル溶液は、緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水）または培地などの溶液を含む。幾つかの実施形態では、培地は、同位体標識された培地である。幾つかの事例では、サンプル溶液は細胞溶液である。

【０２８６】

幾つかの実施形態では、サンプル（例えば細胞または細胞溶液）は、タンパク質のシステイン反応性プローブの相互作用の解析のためにシステイン反応性プローブでインキュベートされる。幾つかの事例では、サンプル（例えば細胞または細胞溶液）は、システイン反応性プローブの追加前に小分子断片が存在下でさらにインキュベートされる。幾つかの事例では、サンプルは対照と比較される。幾つかの事例では、対照は、システイン反応性プローブを含むが、小分子断片を含まない。幾つかの事例では、サンプルと対照との間の

システイン反応性プローブのタンパク質のセットの相互作用間で差が観察される。幾つかの事例では、差は、小分子断片とシステイン含有タンパク質との間の相互作用に相関する。

【０２８７】

幾つかの実施形態では、サンプル（例えば細胞または細胞溶液）は、システイン反応性プローブのタンパク質の相互作用の解析のためにさらに標識される。幾つかの事例では、サンプル（例えば細胞または細胞溶液）は、富化培地で標識される。幾つかの場合では、サンプル（例えば細胞または細胞溶液）は、^{13}Ｃまたは^{15}Ｎで標識したアミノ酸などの、同位体標識されたアミノ酸で標識される。幾つかの場合では、標識されたサンプルは、２つのサンプル間のシステイン反応性プローブのタンパク質の相互作用の差を検出するために、標識されていないサンプルとさらに比較される。幾つかの事例では、この差は、標識されていないサンプルに対する標識されたサンプルにおけるシステイン含有タンパク質および小分子断片とのその相互作用の差である。幾つかの事例では、差は、２つのサンプルにおけるタンパク質のシステイン反応性プローブの相互作用の増大、低下または欠如である。幾つかの事例では、同位体標識された方法は、ＳＩＬＡＣ（細胞培養におけるアミノ酸を使用する安定同位体標識化）と名付けられている。

【０２８８】

幾つかの事例では、サンプルは、第１の細胞溶液および第２の細胞溶液に分けられる。幾つかの場合では、第１の細胞溶液は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第１の群を生成するために、第１のシステイン反応性プローブで第１の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間の間小分子断片でインキュベートされる。幾つかの事例では、長時間は、約５、１０、１５、２０、３０、６０、９０、１２０分またはそれ以上である。幾つかの事例では、第２の細胞溶液は、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体の第２の群を生成するために第２のシステイン反応性プローブを含む。幾つかの事例では、第１のシステイン反応性プローブおよび第２のシステイン反応性プローブは、同じである。幾つかの実施形態では、第２の細胞溶液からの細胞は、対照緩衝液などの緩衝液でさらに処理され、ここで緩衝液は小分子断片を含有していない。幾つかの実施形態では、対照緩衝液はジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含む。

【０２８９】

幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体はさらに、フルオロフォアなどの発色団に結合される。幾つかの事例では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体は、分離され、ゲル電気泳動法またはキャピラリー電気泳動法などの電気泳動を利用して可視化される。典型的なゲル電気泳動法は、アガロースベースのゲル、ポリアクリルアミドベースのゲル、またはデンプンベースのゲルを含む。幾つかの事例では、システイン反応性プローブ－タンパク質は、未変性電気泳動条件にさらされる。幾つかの事例では、システイン反応性プローブ－タンパク質は、変性電気泳動条件にさらされる。

【０２９０】

幾つかの事例では、収集後のシステイン反応性プローブ－タンパク質は、タンパク質断片を生成するために、さらに断片化される。幾つかの事例では、断片化は、機械的ストレス、圧力、または化学的手段によってもたらされる。幾つかの事例では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体からのタンパク質は、化学的手段によって断片化される。幾つかの実施形態では、化学的手段はプロテアーゼである。典型的なプロテアーゼは、限定されないが、キモトリプシンＡ、ペニシリンＧアシラーゼ前駆体、ジペプチターゼＥ、ＤｍｐＡアミノペプチダーゼ、サブチリシン、プロリルオリゴペプチダーゼ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａペプチダーゼ Ｃ、シグナルペプチターゼＩ、サイトメガロウイルスアセンブリン、Ｌｏｎ－Ａペプチダーゼ、ペプチダーゼＣｌｐ、大腸菌ファージＫ１Ｆエンドシアリダーゼ ＣＥＶＩＣＤ、自己切断タンパク質、ヌクレオポリン１４５、ラクトフェリン、ムレインテトラペプチダーゼＬＤ－カルボキシペプチダーゼ、またはロンボイド－１などの、セリンプロテアーゼ；オルニチンアセチルトランスフェラーゼなどのトレオニンプロ

テアーゼ；ＴＥＶプロテアーゼ、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ前駆体、ガンマ－グルタミルヒドロラーゼ（ドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ））、ヘッジホッグタンパク質、ＤｍｐＡ　アミノペプチダーゼ、パパイン、ブロメライン、カテプシンＫ、カルパイン、カスパーゼ－１、セパラーゼ、アデナイン、ピログルタミル－ペプチダーゼＩ、ソルターゼＡ、Ｃ型肝炎ウイルスペプチダーゼ２、シンドビスウイルス型ｎｓＰ２ペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ－ＶＩ、またはＤｅＳＩ－１ペプチダーゼなどの、システインプロテアーゼ；ベーターセクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）、ベーターセクレターゼ２（ＢＡＣＥ２）、カテプシンＤ、カテプシンＥ、キモシン、ナプシン（ｎａｐｓｉｎ）－Ａ、ネペンテシン（ｎｅｐｅｎｔｈｅｓｉｎ）、ペプシン、プラスメプシン、プレセニリン、またはレニンなどの、アスパラギン酸プロテアーゼ；ＡｆｕＧｐｒＡなどのグルタミン酸プロテアーゼ；およびペプチダーゼ＿Ｍ４８などのメタロプロテアーゼを含む。

【０２９１】

幾つかの事例では、断片化はランダム断片化である。幾つかの事例では、断片化が明確な長さのタンパク質断片を生成するか、あるいは剪断力がアミノ酸部位の特定の配列で生じる。

【０２９２】

幾つかの事例では、タンパク質断片は、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）（例えば、高速液体クロマトグラフィー）、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、ガスクロマトグラフィー／質量分析（ＧＣ－ＭＳ）、キャピラリー電気泳動質量分析（ＣＥ－ＭＳ）、または核磁気共鳴イメージング（ＭＲ）などによるプロテオミクス方法によってさらに解析される。

【０２９３】

幾つかの実施形態では、ＬＣ方法は、サンプルのその個別部分への分離のための、当該技術分野で周知の適切なＬＣ方法である。この分離は、サンプルの移動相および固定相との相互作用に基づいて生じる。混合物を分離するときに利用される多くの固定／移動相の組み合わせが存在するため、それらの相の物理状態に基づいて分類される幾つかの異なるタイプのクロマトグラフィーがある。幾つかの実施形態では、ＬＣは、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、置換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、フラッシュクロマトグラフィー、キラルクロマトグラフィー、および水性順相クロマトグラフィーとしてさらに分類される。

【０２９４】

幾つかの実施形態では、ＬＣ方法は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）方法である。幾つかの実施形態では、ＨＰＬＣ方法は、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、置換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、キラルクロマトグラフィー、および水性順相クロマトグラフィーとしてさらに分類される。

【０２９５】

幾つかの実施形態では、本開示のＨＰＬＣ方法は、当該技術分野で周知のあらゆる標準技術によって実行される。典型的なＨＰＬＣ方法は、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（ＨＩＬＩＣ）、静電反発力親水性相互作用液体クロマトグラフィー（ＥＲＬＩＣ）および逆相液体クロマトグラフィー（ＲＰＬＣ）を含む。

【０２９６】

幾つかの実施形態では、ＬＣは、ＬＣ－ＭＳ方法として質量分析に結び付けられる。幾つかの実施形態では、ＬＣ－ＭＳ方法は、超高性能液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析（ＵＰＬＣ－ＥＳＩ－ＱＴＯＦ－ＭＳ）、超高性能液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（ＵＰＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ／ＭＳ）、逆相液体クロマトグラフィー質量分析（ＲＰＬＣ－ＭＳ）、親水性相互作用液体クロマトグラフィー質量分析（ＨＩＬＩＣ－ＭＳ）、親水性相互作用液体

クロマトグラフィー三連四重極タンデム質量分析（ＨＩＬＩＣ－ＱＱＱ）、静電反発力親水性相互作用液体クロマトグラフィー質量分析（ＥＲＬＩＣ－ＭＳ）、液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析（ＬＣ－ＱＴＯＦ－ＭＳ）、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）、タンデム質量分析と結び付けられた多次元液体クロマトグラフィー（ＬＣ／ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）を含む。幾つかの事例では、ＬＣ－ＭＳ方法は、ＬＣ／ＬＣ－ＭＳ／ＭＳである。幾つかの実施形態では、本開示のＬＣ－ＭＳ方法は、当該技術分野で周知の標準技術によって実行される。

【０２９７】

幾つかの実施形態では、ＧＣは、ＧＣ－ＭＳ方法として質量分析に結び付けられる。幾つかの実施形態では、ＧＣ－ＭＳ方法は、二次元ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析（ＧＣ＊ＧＣ－ＴＯＦＭＳ）、ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析（ＧＣ－ＱＴＯＦ－ＭＳ）およびガスクロマトグラフィータンデム質量分析（ＧＣ－ＭＳ／ＭＳ）を含む。

【０２９８】

幾つかの実施形態では、ＣＥは、ＣＥ－ＭＳ方法として質量分析に結び付けられる。幾つかの実施形態では、ＣＥ－ＭＳ方法は、キャピラリー電気泳動－負のエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＣＥ－ＥＳＩ－ＭＳ）、キャピラリー電気泳動－負のエレクトロスプレーイオン化－四重極飛行時間型質量分析（ＣＥ－ＥＳＩ－ＱＴＯＦ－ＭＳ）およびキャピラリー電気泳動－四重極飛行時間型質量分析（ＣＥ－ＱＴＯＦ－ＭＳ）を含む。

【０２９９】

幾つかの実施形態では、核磁気共鳴（ＮＭＲ）方法は、本明細書に開示される１つ以上のシステイン結合タンパク質またはタンパク質断片の検出のための当該技術分野で周知の適切な方法である。幾つかの実施形態では、ＮＭＲ方法は、一次元（１Ｄ）ＮＭＲ方法、二次元の（２Ｄ）ＮＭＲ方法、固体ＮＭＲ方法およびＮＭＲクロマトグラフィーを含む。典型的な１Ｄ ＮＭＲ方法は、^{1}水素、^{13}炭素、^{15}窒素、^{17}酸素、^{19}フッ素、^{31}リン、^{39}カリウム、^{23}ナトリウム、^{33}硫黄、^{87}ストロンチウム、^{27}アルミニウム、^{43}カルシウム、^{35}塩素、^{37}塩素、^{63}銅、^{65}銅、^{57}鉄、^{25}マグネシウム、^{199}水銀、または^{67}亜鉛のＮＭＲ方法、分極移動による歪みのない増強（ＤＥＰＴ）方法、付属プロトン試験（ＡＰＴ）方法および１Ｄ－インクレディブル自然存在比二重量子遷移実験（１Ｄ－ｉｎｃｒｅｄｉｂｌｅ ｎａｔｕｒａｌ ａｂｕｎｄａｎｃｅ ｄｏｕｂｌｅ ｑｕａｎｔｕｍ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ）（ＩＮＡＤＥＱＵＡＴＥ）方法を含む。典型的な２Ｄ ＮＭＲ方法は、相関分光法（ＣＯＳＹ）、全相関分光法（ＴＯＣＳＹ）、２Ｄ－ＩＮＡＤＥＱＵＡＴＥ、２Ｄ－アデクエイト二重量子遷移実験（２Ｄ－ａｄｅｑｕａｔｅ ｄｏｕｂｌｅ ｑｕａｎｔｕｍ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ）（ＡＤＥＱＵＡＴＥ）、核オーバーハウザー効果分光法（ＮＯＳＥＹ）、回転フレームＮＯＥ分光法（ＲＯＥＳＹ）、異種核多量子相関分光法（ｈｅｔｅｒｏｎｕｃｌｅａｒ ｍｕｌｔｉｐｌｅ－ｑｕａｎｔｕｍ ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）（ＨＭＱＣ）、異種核単一量子コヒーレンス分光法（ｈｅｔｅｒｏｎｕｃｌｅａｒ ｓｉｎｇｌｅ ｑｕａｎｔｕｍ ｃｏｈｅｒｅｎｃｅ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）（ＨＳＱＣ）、近距離カップリング（ｓｈｏｒｔ ｒａｎｇｅ ｃｏｕｐｌｉｎｇ）および遠距離カップリング（ｌｏｎｇ ｒａｎｇｅ ｃｏｕｐｌｉｎｇ）の方法を含む。典型的な固体ＮＭＲ方法は、固体^{13}炭素ＮＭＲ、高解像度のマジック角回転（ＨＲ－ＭＡＳ）および交差分極のマジック角回転（ＣＰ－ＭＡＳ）のＮＭＲ方法を含む。典型的なＮＭＲ技術は、拡散秩序化分光法（ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ ｏｒｄｅｒｅｄ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）（ＤＯＳＹ）、ＤＯＳＹ－ＴＯＣＳＹおよびＤＯＳＹ－ＨＳＱＣを含む。

【０３００】

幾つかの実施形態では、タンパク質断片は、Ｗｅｅｒａｐａｎａ ｅｔ ａｌ．，“Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｒｅａｃｔｉｖｉｔｙ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｐｒｅｄｉｃｔｓ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｙｓｔｅｉｎｅｓ ｉｎ ｐｒｏｔｅｏｍｅｓ，”Ｎａｔｕｒｅ，４６８：７９０－７９５（２０１０）に記載されるような方法によって解析される。

【０３０１】
幾つかの実施形態では、質量分析方法からの結果は、タンパク質同定のためにアルゴリズムによって解析される。幾つかの実施形態では、アルゴリズムは、タンパク質同定のために質量分析方法からの結果をタンパク質の配列データベースと組み合わせる。幾つかの実施形態では、アルゴリズムは、ＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム、Ｐｒｏｂｉｔｙ、Ｓｃａｆｆｏｌｄ、ＳＥＱＵＥＳＴ、またはＭａｓｃｏｔを含む。
【０３０２】
幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブ－タンパク質複合体からタンパク質の各々に値が割り当てられる。幾つかの実施形態では、システイン反応性プローブのタンパク質複合体からタンパク質の各々に割り当てられた値は、質量分析の解析から得られる。幾つかの事例では、値は、質量電荷比に応じたシグナル強度のプロットからの曲線下面積である。幾つかの実施形態では、第１の細胞溶液から得られたタンパク質に第１の値が割り当てられ、第２の細胞溶液から得られた同じタンパク質に第２の値が割り当てられる。幾つかの事例では、２つの値間の比率が計算される。幾つかの事例では、２を超える比率は、タンパク質が薬物と相互作用するための候補であるか、またはシステイン結合タンパク質であることを示している。幾つかの事例では、比率は、２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０を超える。幾つかの場合では、比率は最大で２０である。
【０３０３】
幾つかの事例では、比率は、平均された値に基づいて計算される。幾つかの事例では、平均された値は、各細胞溶液からのタンパク質の少なくとも２つ、３つ、または４つの値の平均であるか、あるいはタンパク質が各細胞溶液において少なくとも２、３、または４回観察され、各々の観察された時間に値が割り当てられる。幾つかの事例では、比率はさらに、１２、１０、または８未満の標準偏差を有する。
【０３０４】
幾つかの事例では、値は平均された値ではない。幾つかの事例では、比率は、細胞集団において一度だけ観察されたタンパク質の値に基づいて計算される。幾つかの事例では、比率は、２０の値とともに割り当てられる。
【０３０５】
幾つかの実施形態では、システイン含有タンパク質を小断片分子結合標的として特定する関連で、２つの細胞溶液から第１の比率が得られ、ここで両方の細胞溶液はシステイン反応性プローブでインキュベートされた、第１の細胞溶液は小分子断片でさらにインキュベートされる。幾つかの事例では、第１の比率は、両方の細胞溶液が小分子断片がない状態でシステイン反応性プローブによって処理された第２の比率とさらに比較される。幾つかの事例では、第１の比率は、０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０を超える。幾つかの事例では、第２の比率は、０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０を超える。幾つかの事例の、第１の比率が、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０を超え、第２の比率が約０．５乃至約２である場合、２つの比率は、タンパク質が薬物結合標的であることを示す。
【０３０６】
幾つかの実施形態では、値によってさらに、システイン含有タンパク質に対するシステイン反応性プローブの阻害のパーセンテージを計算することができる。幾つかの実施形態では、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％を超える阻害のパーセンテージは、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互作用するための候補であることを示している。
【０３０７】
＜キット／製品＞

本明細書には、特定の実施形態において、本明細書に記載される１つ以上の方法との使用のためのキットおよび製品が開示される。幾つかの実施形態において、本明細書には、システイン含有タンパク質を小分子断片結合標的として特定するためのキットが記載される。幾つかの事例において、本明細書にはまた、結合部位をシステイン含有タンパク質上にマッピングするためのキットが記載される。幾つかの場合において、本明細書には、システイン結合タンパク質を特定するためのキットが記載される。幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、システイン含有タンパク質との相互作用のための小分子断片のハイスループットスクリーニングのためのキットが記載される。

【０３０８】

幾つかの実施形態では、そのようなキットは、本明細書に記載されるシステイン反応性プローブなどのシステイン反応性プローブは、小分子断片またはライブラリー及び／又は対照などの試験化合物、および本明細書に記載される方法の１つ以上を実行するのに適した試薬を含む。幾つかの事例では、キットはさらに、細胞サンプルなどのサンプル、および緩衝液または培地などの適切な溶液を含む。幾つかの実施形態では、キットはさらに、本明細書に記載される方法の１つ以上での使用のための組換えタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、キットの追加のコンポーネントは、バイアル、チューブなどの１つ以上の容器を受けるように区画されている、担体、パッケージ、または容器を含み、容器の各々は、本明細書に記載される方法で使用される別個の要素の１つを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、プレート、シリンジ、および試験管が挙げられる。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。

【０３０９】

本明細書に提供される製品は、パッケージング材を含む。製薬用のパッケージング材の例としては、限定されないが、ボトル、チューブ、バッグ、容器、および選択される製剤および意図した使用の様式に適したパッケージング材が挙げられる。

【０３１０】

例えば、容器は、本明細書に開示される方法における使用のためのシステイン反応性プローブ、試験化合物、および１つ以上の試薬を含む。このようなキットは、随意に、識別用の記述またはラベル、あるいは本明細書に記載される方法での使用に関する説明書を含む。

【０３１１】

キットはまた、内容物をリストするラベル及び／又は使用のための説明書、および使用のための説明書が伴う添付文書を含む。典型的に説明書のセットも含まれる。一実施形態では、ラベルは、容器上にあるか又はそれに関連付けられている。一実施形態では、ラベルは、それを形成する字、数字または他の文字が、容器自体に付けられているか、成型されているか、またはエッチングされるときに容器上にあり、容器をも保持するレセプタクルまたは担体内に存在するときに、例えば添付文書として、容器と関連付けられている。一実施形態では、ラベルは、内容物が具体的な治療用途に使用されることを示すために使用される。ラベルはまた、本明細書に記載される方法などにおける、内容物の使用のための指示を示す。

【０３１２】

＜サービス＞

幾つかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、サービスとしても機能する。幾つかの事例では、サービスプロバイダーは、スクリーニングのためのシステイン反応性プローブの１つ以上とともに解析のための複数の小分子断片の候補を顧客から得る。幾つかの実施形態では、サービスプロバイダーは、本明細書に記載される方法の１つ以上を使用して、小分子断片の候補をスクリーニングし、その後、その結果を顧客に提供する。幾つかの事例では、サービスプロバイダーは、システイン反応性プローブの１つ以上および本明細書に記載される方法の１つ以上を利用する解析のために適切な試薬を顧客に提供する。幾つかの場合では、顧客は、本明細書に記載される方法の１つ以上を実行し、その後、解析のためにその結果をサービスプロバイダーに提供する。幾つかの実施形態では、サー

ビスプロバイダーは、その後、結果を解析し、顧客に提供する。幾つかの場合では、顧客は、（顧客の場所で）ローカルにまたは（例えば、ネットワークを介して到達可能なサーバー上で）遠隔にインストールされたソフトウェアと対話することによって、結果をさらに解析する。典型的な顧客は、製薬会社、臨床検査室、医師、患者などを含む。幾つかの事例では、顧客は、本明細書に記載される方法、システム、組成物、およびキットを使用する必要のある又はそれを望む適切な顧客または関係者である。

【０３１３】

＜デジタル処理装置＞

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、デジタル処理装置、またはその使用を含む。さらなる実施形態では、デジタル処理装置は、装置の機能を実行する１つ以上のハードウェア中央処理装置（ＣＰＵ）を含む。またさらなる実施形態では、デジタル処理装置は、実行可能命令を実行するように構成されたオペレーティングシステムをさらに含む。幾つかの実施形態では、デジタル処理装置は、コンピュータネットワークに随意に接続される。さらなる実施形態では、デジタル処理装置は、ワールドワイドウェブ（Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂ）にアクセスするようにインターネットに随意に接続される。またさらなる実施形態では、デジタル処理装置は、クラウド・コンピューティング・インフラストラクチャーに随意に接続される。他の実施形態では、デジタル処理装置は、イントラネットに随意に接続される。他の実施形態では、デジタル処理装置は、データ記憶装置に随意に接続される。

【０３１４】

本明細書の記載に従って、適切なデジタル処理装置は、限定されないが、サーバーコンピュータ、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、ノート型コンピュータ、サブノート型コンピュータ、ネットブックコンピュータ、ネットパッドコンピュータ、セットトップコンピュータ、メディアストリーミング装置、ハンドヘルドコンピュータ、インターネットアプライアンス、モバイルスマートフォン、タブレットコンピュータ、携帯情報端末、ビデオゲーム機、および媒体を含む。適切なタブレットコンピュータは、ブックレット、スレートまたは変換可能な構成を含む。

【０３１５】

幾つかの実施形態では、デジタル処理装置は、実行可能命令を実行するように構成されたオペレーティングシステムを含む。オペレーティングシステムは、例えば、装置のハードウェアを管理し、アプリケーションの実行のためのサービスを提供する、プログラムおよびデータを含むソフトウェアである。適切なサーバーオペレーティングシステムは、限定しない例として、ＦｒｅｅＢＳＤ、ＯｐｅｎＢＳＤ、ＮｅｔＢＳＤ（登録商標）、Ｌｉｎｕｘ（登録商標）、Ａｐｐｌｅ（登録商標）Ｍａｃ ＯＳ Ｘ Ｓｅｒｖｅｒ（登録商標）、Ｏｒａｃｌｅ（登録商標）Ｓｏｌａｒｉｓ（登録商標）、Ｗｉｎｄｏｗｓ Ｓｅｒｖｅｒ（登録商標）、およびＮｏｖｅｌｌ（登録商標）ＮｅｔＷａｒｅ（登録商標）を含む。適切なパーソナルコンピュータのオペレーティングシステムは、限定しない例として、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）、Ａｐｐｌｅ（登録商標）Ｍａｃ ＯＳ Ｘ（登録商標）、ＵＮＩＸ（登録商標）、およびＧＮＵ／Ｌｉｎｕｘ（登録商標）などのＵＮＩＸ（登録商標）様のオペレーティングシステムを含む。幾つかの実施形態では、オペレーティングシステムは、クラウドコンピューティングによって提供される。適切なモバイルスマートフォンのオペレーティングシステムは、限定しない例として、Ｎｏｋｉａ（登録商標）Ｓｙｍｂｉａｎ（登録商標）ＯＳ、Ａｐｐｌｅ（登録商標）ｉＯＳ（登録商標）、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎ Ｍｏｔｉｏｎ（登録商標）ＢｌａｃｋＢｅｒｒｙ ＯＳ（登録商標）、Ｇｏｏｇｌｅ（登録商標）Ａｎｄｒｏｉｄ（登録商標）、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｗｉｎｄｏｗｓ Ｐｈｏｎｅ（登録商標）ＯＳ、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｗｉｎｄｏｗｓ Ｍｏｂｉｌｅ（登録商標）ＯＳ、Ｌｉｎｕｘ（登録商標）、およびＰａｌｍ（登録商標）ＷｅｂＯＳ（登録商標）を含む。適切な媒体ストリーミング装置のオペレーティングシステムは、限定しない例として、Ａｐｐｌｅ ＴＶ（登録商標）、Ｒｏｋｕ（登録商標）、Ｂｏｘｅｅ（登録商標）、Ｇｏｏｇｌｅ ＴＶ（

登録商標）、Ｇｏｏｇｌｅ Ｃｈｒｏｍｅｃａｓｔ（登録商標）、Ａｍａｚｏｎ Ｆｉｒｅ（登録商標）、およびＳａｍｓｕｎｇ（登録商標）ＨｏｍｅＳｙｎｃ（登録商標）を含む。適切なビデオゲーム機のオペレーティングシステムは、限定しない例として、Ｓｏｎｙ（登録商標）ＰＳ３（登録商標）、Ｓｏｎｙ（登録商標）ＰＳ４（登録商標）、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｘｂｏｘ ３６０（登録商標）、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｘｂｏｘ Ｏｎｅ、Ｎｉｎｔｅｎｄｏ（登録商標）Ｗｉｉ（登録商標）、Ｎｉｎｔｅｎｄｏ（登録商標）Ｗｉｉ Ｕ（登録商標）、およびＯｕｙａ（登録商標）を含む。幾つかの実施形態では、装置は、記憶装置及び／又はメモリ装置を含む。記憶装置及び／又はメモリ装置は、一時的又は恒久的にデータまたはプログラムを保存するために使用される１以上の物理的な機器である。幾つかの実施形態では、メモリ装置は、揮発性メモリであり、保存した情報を維持するための動力を必要とする。幾つかの実施形態では、メモリ装置は、不揮発性メモリであり、デジタル処理装置に動力が供給されないときに、保存した情報を保持する。さらなる実施形態では、不揮発性メモリは、フラッシュメモリを含む。幾つかの実施形態では、不揮発性メモリは、ダイナミック・ランダム・アクセス・メモリ（ＤＲＡＭ）を含む。幾つかの実施形態では、不揮発性メモリは、強誘電体ランダムアクセスメモリ（ＦＲＡＭ）を含む。幾つかの実施形態では、不揮発性メモリは、相変化ランダムアクセスメモリ（ＰＲＡＭ）を含む。他の実施形態では、装置は、限定しない例として、ＣＤ－ＲＯＭ、ＤＶＤ、フラッシュメモリ装置、磁気ディスクドライブ、磁気テープドライブ、光ディスクドライブ、およびクラウドコンピューティングベースのストレージを含む、記憶装置である。さらなる実施形態では、記憶装置及び／又はメモリ装置は、本明細書に開示されるものなどの装置の組み合わせである。

【０３１６】

幾つかの実施形態では、デジタル処理装置は、ユーザーに視覚情報を送信するためのディスプレイを備える。幾つかの実施形態では、ディスプレイは、陰極線管（ＣＲＴ）、液晶ディスプレイ（ＬＣＤ）、薄膜トランジスター液晶ディスプレイ（ＴＦＴ－ＬＣＤ）、有機発光ダイオード（ＯＬＥＤ）ディスプレイ、プラズマディスプレイ、ビデオプロジェクター、またはそれらの組み合わせを含む。

【０３１７】

幾つかの実施形態では、デジタル処理装置は、ユーザーから情報を受信するための入力装置を備える。幾つかの実施形態では、入力装置は、キーボードである。幾つかの実施形態では、入力装置は、限定しない例として、マウス、トラックボール、トラックパッド、ジョイスティック、ゲームコントローラ、またはスタイラスを含むポインティング装置である。幾つかの実施形態では、入力装置は、タッチスクリーンまたはマルタッチスクリーンである。他の実施形態では、入力装置は、声または他の音入力を捕らえるマイクロフォンである。他の実施形態では、入力装置は、動作または視覚の入力を捕らえるビデオカメラまたは他のセンサーである。さらなる実施形態では、入力装置は、Ｋｉｎｅｃｔ（商標）、Ｌｅａｐ Ｍｏｔｉｏｎ（商標）などである。またさらなる実施形態では、入力装置は、本明細書に開示されるものなどの装置の組み合わせである。

【０３１８】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示されるシステムおよび方法は、随意にネットワーク化されたデジタル処理装置のオペレーティングシステムによって実行可能な命令を含むプログラムでコードされた、１つ以上の非一時的コンピュータ可読記憶媒体を含む。さらなる実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、デジタル処理装置の有形成分である。またさらなる実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、随意に、デジタル処理装置から取り外し可能である。幾つかの実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、限定しない例として、ＣＤ－ＲＯＭ、ＤＶＤ、フラッシュメモリ装置、ソリッドステートメモリ、磁気ディスクドライブ、磁気テープドライブ、光ディスクドライブ、クラウドコンピューティングのシステムおよびサービスなどを含む。幾つかの場合では、プログラムおよび命令は、媒体上で恒久的に、略恒久的に、半恒久的に、または非一時的にコードされる。

【０３１９】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示されるシステムおよび方法は、少なくとも１つのコンピュータプログラム、またはその使用を含む。コンピュータプログラムは、タスクを実行するために書き込まれた、デジタル処理装置のＣＰＵにおいて実行可能である命令のシーケンスを含む。幾つかの実施形態では、コンピュータ可読命令は、特定のタスクを実行する又は特定の抽象データ型を実装する、機能、オブジェクト、アプリケーションプログラムインターフェース（ＡＰＩ）、データ構造などのプログラムモジュールとして実施される。

【０３２０】

幾つかの実施形態では、コンピュータ可読命令の機能性は、様々な環境に望ましいものとして組み合わせられるか、または分布される。幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、命令の１つのシーケンスを含む。幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、命令の複数のシーケンスを含む。幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、１つの場所から提供される。他の実施形態では、コンピュータプログラムは、複数の場所から提供される。様々な実施形態では、コンピュータプログラムは、１以上のソフトウェアモジュールを含む。様々な実施形態では、コンピュータプログラムは、含む、部分的に又は全体的に、１つ以上のウェブアプリケーション、１つ以上のモバイルアプリケーション、１つ以上、スタンドアロンアプリケーション、１つ以上のウェブブラウザプラグイン、拡張子、アドイン、またはアドオン、あるいはそれらの組み合わせを含む。

【０３２１】

幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムはウェブアプリケーションを含む。ウェブアプリケーションは、様々な実施形態において、１つ以上のソフトウェアフレームワークおよび１つ以上のデータベースシステムを利用する。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）．ＮＥＴまたはＲｕｂｙ ｏｎ Ｒａｉｌｓ（ＲｏＲ）などのソフトウェアフレームワーク上で作成される。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、限定しない例として、リレーショナル、非リレーショナル、オブジェクト指向、連想、およびＸＭＬのデータベースシステムを含む、１つ以上のデータベースシステムを利用する。さらなる実施形態では、適切なリレーショナルデータベースシステムは、限定しない例として、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）ＳＱＬ Ｓｅｒｖｅｒ、ｍｙＳＱＬ（商標）、およびＯｒａｃｌｅ（登録商標）を含む。ウェブアプリケーションは、様々な実施形態において、１つ以上の言語の１つ以上のバージョンで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、１つ以上のマークアップ言語、プレゼンテーション定義言語、クライアント側スクリプト言語、サーバー側コーディング言語、データベース問い合わせ言語、またはそれらの組み合わせで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ハイパーテキストマークアップ言語（ＨＴＭＬ）、拡張可能ハイパーテキストにおいてマークアップ（ＸＨＴＭＬ）または拡張可能マークアップ（ＸＭＬ）などのマークアップ言語である程度まで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、カスケーディング・スタイル・シート（ＣＳＳ）などのプレゼンテーション定義言語である程度まで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、エイジャックス（Ａｓｙｎｃｈｒｏｎｏｕｓ Ｊａｖａｓｃｒｉｐｔ（登録商標） ａｎｄ ＸＭＬ（ＡＪＡＸ）、Ｆｌａｓｈ（登録商標）Ａｃｔｉｏｎｓｃｒｉｐｔ、Ｊａｖａｓｃｒｉｐｔ（登録商標）、またはＳｉｌｖｅｒｌｉｇｈｔ（登録商標）などの、クライアント側スクリプト言語である程度まで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、Ａｃｔｉｖｅ Ｓｅｒｖｅｒ Ｐａｇｅｓ（ＡＳＰ）、ＣｏｌｄＦｕｓｉｏｎ（登録商標）、Ｐｅｒｌ、Ｊａｖａ（商標）、Ｊａｖａ Ｓｅｒｖｅｒ Ｐａｇｅｓ（ＪＳＰ）、Ｈｙｐｅｒｔｅｘｔ Ｐｒｅｐｒｏｃｅｓｓｏｒ（ＰＨＰ）、Ｐｙｔｈｏｎ（商標）、Ｒｕｂｙ、Ｔｃｌ、Ｓｍａｌｌｔａｌｋ、ＷｅｂＤＮＡ（登録商標）、またはＧｒｏｏｖｙなどの、サーバー側コード言語である程度まで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、構造化照会言語（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｑｕｅｒｙ Ｌａｎｇｕａｇｅ）（ＳＱＬ）などのデータベース問い合わせ言語である程度まで書かれる。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、Ｉ

ＢＭ（登録商標）Ｌｏｔｕｓ Ｄｏｍｉｎｏ（登録商標）などの企業サーバー製品を統合する。幾つかの実施形態では、ウェブアプリケーションはメディアプレイヤー要素を含む。様々なさらなる実施形態では、メディアプレイヤー要素は、限定しない例として、Ａｄｏｂｅ（登録商標）Ｆｌａｓｈ（登録商標）、ＨＴＭＬ５、Ａｐｐｌｅ（登録商標）ＱｕｉｃｋＴｉｍｅ（登録商標）、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｓｉｌｖｅｒｌｉｇｈｔ（登録商標）、Ｊａｖａ（商標）、およびＵｎｉｔｙ（登録商標）を含む、多くの適切なマルチメディア技術の１つ以上を利用する。

【０３２２】

幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、モバイルデジタル処理装置に提供されるモバイルアプリケーションを含む。幾つかの実施形態では、モバイルアプリケーションは、モバイルデジタル処理装置にそれが製造される時に提供される。他の実施形態では、モバイルアプリケーションは、本明細書に記載されるコンピュータネットワークを介してモバイルデジタル処理装置に提供される。

【０３２３】

本明細書に提供される開示に照らすと、モバイルアプリケーションは、ハードウェア、言語、および開発環境を使用する技術によって作成される。適切なプログラミング言語は、限定しない例として、ＣＳＳを有する又は有さない、Ｃ、Ｃ＋＋、Ｃ＃、オブジェクティブＣ（Ｏｂｊｅｃｔｉｖｅ－Ｃ）、Ｊａｖａ（商標）、Ｊａｖａｓｃｒｉｐｔ（登録商標）、Ｐａｓｃａｌ、Ｏｂｊｅｃｔ Ｐａｓｃａｌ、Ｐｙｔｈｏｎ（商標）、Ｒｕｂｙ、ＶＢ．ＮＥＴ、ＷＭＬ、およびＸＨＴＭＬ／ＨＴＭＬ、またはそれらの組み合わせを含む。

【０３２４】

適切なモバイルアプリケーションの開発環境は、幾つかのソースから利用可能である。市販の開発環境は、限定しない例として、ＡｉｒｐｌａｙＳＤＫ、ａｌｃｈｅＭｏ、Ａｐｐｃｅｌｅｒａｔｏｒ（登録商標）、Ｃｅｌｓｉｕｓ、Ｂｅｄｒｏｃｋ、Ｆｌａｓｈ Ｌｉｔｅ、．ＮＥＴ Ｃｏｍｐａｃｔ Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ、Ｒｈｏｍｏｂｉｌｅ、およびＷｏｒｋＬｉｇｈｔ Ｍｏｂｉｌｅ Ｐｌａｔｆｏｒｍを含む。他の開発環境は、コストをかけることなく利用可能であり、その限定しない例として、Ｌａｚａｒｕｓ、ＭｏｂｉＦｌｅｘ、ＭｏＳｙｎｃ、およびＰｈｏｎｅｇａｐを含む。また、モバイルデバイスの製造業者は、限定しない例として、ｉＰｈｏｎｅ（登録商標）およびｉＰａｄ（登録商標）（ｉＯＳ）ＳＤＫ、アンドロイド（商標）ＳＤＫ、ＢｌａｃｋＢｅｒｒｙ（登録商標）ＳＤＫ、ＢＲＥＷ ＳＤＫ、Ｐａｌｍ（登録商標）ＯＳ ＳＤＫ、Ｓｙｍｂｉａｎ ＳＤＫ、ｗｅｂＯＳ ＳＤＫ、およびＷｉｎｄｏｗｓ（登録商標）Ｍｏｂｉｌｅ ＳＤＫを含む、ソフトウェアディベロッパキットを流通させている。

【０３２５】

幾つかの実施形態では、モバイルアプリケーションの流通ための商用フォーラムは、限定しない例として、Ａｐｐｌｅ（登録商標）Ａｐｐ Ｓｔｏｒｅ、アンドロイドの（商標）Ｍａｒｋｅｔ、ＢｌａｃｋＢｅｒｒｙ（登録商標）Ａｐｐ Ｗｏｒｌｄ、Ａｐｐ Ｓｔｏｒｅ ｆｏｒ Ｐａｌｍ ｄｅｖｉｃｅ、Ａｐｐ Ｃａｔａｌｏｇ ｆｏｒ ｗｅｂＯＳ、Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）Ｍａｒｋｅｔｐｌａｃｅ ｆｏｒ Ｍｏｂｉｌｅ、Ｏｖｉ Ｓｔｏｒｅ ｆｏｒ Ｎｏｋｉａ（登録商標）装置、Ｓａｍｓｕｎｇ（登録商標）Ａｐｐｓ、およびＮｉｎｔｅｎｄｏ（登録商標）ＤＳｉ Ｓｈｏｐを含む。

【０３２６】

幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、既存プロセスに対するアドオンでない、例えば、プラグインでない、独立したコンピュータプロセスとして実行されるプログラムである、スタンドアロンアプリケーションを含む。幾つかの事例では、スタンドアロンアプリケーションはコンパイルされる。コンパイラーは、プログラミング言語で書き込まれたソースコードをアセンブリ言語または機械コードなどのバイナリーオブジェクトコードに変換するコンピュータプログラムである。適切なコンパイルされたプログラミング言語は、限定しない例として、Ｃ、Ｃ＋＋、オブジェクティブＣ、ＣＯＢＯＬ、Ｄｅｌ

ｐｈｉ、Ｅｉｆｆｅｌ、Ｊａｖａ（商標）、Ｌｉｓｐ、Ｐｙｔｈｏｎ（商標）、Ｖｉｓｕａｌ Ｂａｓｉｃ（登録商標）、およびＶＢ．ＮＥＴ、またはそれらの組み合わせを含む。コンパイルは、少なくとも部分的に実行可能プログラムを作成するためにしばしば実行される。幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、１つ以上のソフトウェアモジュールを含む。

【０３２７】
幾つかの実施形態では、コンピュータプログラムは、ウェブブラウザプラグインを含む。コンピューティングでは、プラグインは、より大きなソフトウェアアプリケーションに具体的な機能性を加える１つ以上のソフトウェアコンポーネントである。第三者の開発者がアプリケーションを拡張する能力を作成する、容易に新しい特徴を加えるサポートを行う、およびアプリケーションのサイズを縮小することができるように、ソフトウェアアプリケーションのメーカーは、プラグインをサポートする。サポートされるときに、プラグインは、ソフトウェアアプリケーションの機能性のカスタマイズを可能にする。例えば、プラグインは、一般に、ビデオを再生する、対話機能を作成する、ウイルスをスキャンする、および特定のファイルタイプを表示するために、ウェブブラウザで使用される。幾つかの事例では、ウェブブラウザプラグインは、Ａｄｏｂｅ（登録商標）Ｆｌａｓｈ（登録商標）Ｐｌａｙｅｒ、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｓｉｌｖｅｒｌｉｇｈｔ（登録商標）、およびＡｐｐｌｅ（登録商標）ＱｕｉｃｋＴｉｍｅ（登録商標）を含む。幾つかの実施形態では、ツールバーは、１つ以上のウェブブラウザ拡張機能、アドイン、またはアドオンを含む。幾つかの実施形態では、ツールバーは、１つ以上のエクスプローラーバー、ツールバンド、またはデスクバンドを含む。

【０３２８】
本明細書に提供される開示に照らすと、限定しない例として、Ｃ＋＋、Ｄｅｌｐｈｉ、Ｊａｖａ（商標）、ＰＨＰ、Ｐｙｔｈｏｎ（商標）、およびＶＢ．ＮＥＴ、またはそれらの組み合わせを含む、様々なプログラミング言語でのプラグインの開発を可能にする、プラグインのフレームワークが利用可能である。

【０３２９】
ウェブブラウザ（インターネットブラウザとも呼ばれる）は、ワールドワイドウェブ上の情報資源を検索する、表示する、およびスキャンする（ｔｒａｖｅｒｓｉｎｇ）ための、ネットワーク接続したデジタル処理装置との使用のために設計された、ソフトウェアアプリケーションである。適切なウェブブラウザは、限定しない例として、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｉｎｔｅｒｎｅｔ Ｅｘｐｌｏｒｅｒ（登録商標）、Ｍｏｚｉｌｌａ（登録商標）Ｆｉｒｅｆｏｘ（登録商標）、Ｇｏｏｇｌｅ（登録商標）Ｃｈｒｏｍｅ、Ａｐｐｌｅ（登録商標）Ｓａｆａｒｉ（登録商標）、Ｏｐｅｒａ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（登録商標）Ｏｐｅｒａ（登録商標）、およびＫＤＥ Ｋｏｎｑｕｅｒｏｒを含む。幾つかの実施形態では、ウェブブラウザは、モバイルのウェブブラウザである。モバイルのウェブブラウザ（マイクロブラウザ、ミニブラウザ、およびワイヤレスブラウザ）は、限定しない例として、ハンドヘルドコンピュータ、タブレットコンピュータ、ネットブックコンピュータ、サブノートブックコンピュータ、スマートフォン、ニュージックプレーヤー、携帯情報端末（ＰＤＡ）およびハンドヘルドビデオゲームシステムを含む、モバイルのデジタル処理装置上の使用のために設計されている。適切なモバイルのウェブブラウザは、限定しない例として、Ｇｏｏｇｌｅ（登録商標）Ａｎｄｒｏｉｄ（登録商標）ブラウザ、ＲＦＭ ＢｌａｃｋＢｅｒｒｙ（登録商標）Ｂｒｏｗｓｅｒ、Ａｐｐｌｅ（登録商標）Ｓａｆａｒｉ（登録商標）、Ｐａｌｍ（登録商標）Ｂｌａｚｅｒ、Ｐａｌｍ（登録商標）ＷｅｂＯＳ（登録商標）Ｂｒｏｗｓｅｒ、携帯用のＭｏｚｉｌｌａ（登録商標）Ｆｉｒｅｆｏｘ（登録商標）、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ（登録商標）Ｉｎｔｅｒｎｅｔ Ｅｘｐｌｏｒｅｒ（登録商標）Ｍｏｂｉｌｅ、Ａｍａｚｏｎ（登録商標）Ｋｉｎｄｌｅ（登録商標）Ｂａｓｉｃ Ｗｅｂ、Ｎｏｋｉａ（登録商標）Ｂｒｏｗｓｅｒ、Ｏｐｅｒａ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（登録商標）Ｏｐｅｒａ（登録商標）Ｍｏｂｉｌ、およびＳｏｎｙ（登録商標）ＰＳＰ（商標）

ブラウザを含む。

【０３３０】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示されるシステムおよび方法は、ソフトウェア、サーバー、及び／又はデータベースモジュール、またはそれらの使用を含む。本明細書に提供される開示に照らすと、ソフトウェアモジュールは、多数の方法で作成され、実施される。様々な実施形態では、ソフトウェアモジュールは、ファイル、コードのセクション、プログラミングオブジェクト、プログラミング構造、またはそれらの組み合わせを含む。さらなる様々な実施形態では、ソフトウェアモジュールは、複数のファイル、複数のコードのセクション、複数のプログラミングオブジェクト、複数のプログラミング構造、またそれらの組み合わせを含む。様々な実施形態では、１つ以上のソフトウェアモジュールは、限定しない例として、ウェブアプリケーション、モバイルアプリケーション、およびスタンドアロンアプリケーションを含む。幾つかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つのコンピュータプログラムまたはアプリケーション中にある。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つを超えるコンピュータプログラムまたはアプリケーション中にある。幾つかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つのマシン上でホストされる。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つを超えるマシン上でホストされる。さらなる実施形態では、ソフトウェアモジュールは、クラウドコンピューティングプラットフォーム上でホストされる。幾つかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つの場所において１つ以上のマシン上でホストされる。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、１つを超える位置において１つ以上のマシン上でホストされる。

【０３３１】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法及びシステムは、１以上のデータベース又はその使用を含む。本明細書で提供される開示に照らして、データベースは、本明細書に別記される分析情報の記憶及び検索に適している。様々な実施形態において、適切なデータベースは、限定されないが、リレーショナルデータベース、非リレーショナルデータベース、オブジェクト指向型データベース、オブジェクトデータベース、実体関連モデルデータベース、連想データベース、及びＸＭＬデータベースを含む。他の実施形態において、データベースはインターネットベースである。更なる実施形態において、データベースはウェブベースである。また更なる実施形態において、データベースは、クラウドコンピューティングベースである。他の実施形態において、データベースは、１以上のローカルコンピュータ記憶デバイスベースである。

【０３３２】

サーバー

幾つかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、サーバー又はコンピュータサーバー上で処理される（図２）。幾つかの実施形態において、サーバー（４０１）は、シングルコアプロセッサ、マルチコアプロセッサ、又は、並行処理のための複数のプロセッサである、中央処理装置（ＣＰＵ、「プロセッサ」とも称す）（４０５）を含む。幾つかの実施形態において、制御組立体の一部として使用されるプロセッサは、マイクロプロセッサである。幾つかの実施形態において、サーバー（４０１）はまた、メモリ（４１０）（例えば、ランダムアクセスメモリー、読み出し専用メモリ、フラッシュメモリ）；電子記憶装置（４１５）（例えばハードディスク）；１以上の他のシステムと通信するための通信用インターフェース（４２０）（例えばネットワークアダプタ）；及び、キャッシュ、他のメモリ、データストレージ、及び／又は電子ディスプレイアダプタを含む周辺機器（４２５）を含む。メモリ（４１０）、記憶装置（４１５）、インターフェース（４２０）、及び周辺機器（４２５）は、マザーボードなどの通信バス（実線）を介したプロセッサ（４０５）との通信状態にある。幾つかの実施形態において、記憶装置（４１５）は、データを保存するためのデータ記憶装置である。サーバー（４０１）は、通信用インターフェース（４２０）の補助によりコンピュータネットワーク（「ネットワーク」）（４３０）に動作自在につながれる。幾つかの実施形態において、追加のハードウェアの補助

によりプロセッサも、ネットワークに動作自在につながれる。幾つかの実施形態において、ネットワーク（４３０）は、インターネット、イントラネット及び／又はエクストラネット、インターネットと通信状態にあるイントラネット及び／又はエクストラネット、テレコミュニケーション、又はデータネットワークである。幾つかの実施形態において、サーバー（４０１）の補助によりネットワーク（４３０）は、サーバー（４０１）につながれたデバイスがクライアント又はサーバーとして作用するのを可能にする、ピアツーピアのネットワークを実施する。幾つかの実施形態において、サーバーは、ネットワーク（４３０）を通って運ばれた電子信号を介して、コンピュータ可読命令（例えば、デバイス／システム動作プロトコル又はパラメータ）、又はデータ（例えば、センサー測定値、代謝物質の検出から得た生データ、代謝物質の検出から得た生データの解析、代謝物質の検出から得た生データの解釈など）を送受信することができる。更に、幾つかの実施形態において、ネットワークは例えば、国境線にわたってデータを送受信するために使用される。

【０３３３】

幾つかの実施形態において、サーバー（４０１）は、ディスプレイ又はプリンターなどの１以上の出力装置（４３５）と通信状態に、及び／又は、例えばキーボード、マウス、又はジョイスティックなどの１以上の入力装置（４４０）と通信状態にある。幾つかの実施形態において、ディスプレイはタッチスクリーンディスプレイであり、その場合、ディスプレイ装置と入力装置の両方として機能する。幾つかの実施形態において、異なる及び／又は追加の入力装置は、アナンシエイタ（ｅｎｕｎｃｉａｔｏｒ）、スピーカー、又はマイクロフォンなどとして提供される。幾つかの実施形態において、サーバーは、例えば、Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）、ＭａｃＯＳ（登録商標）、又はＵｎｉｘ（登録商標）、或いはＬｉｎｕｘ（登録商標）の様々なバージョンの何れか１つなどの、様々な動作システムの何れか１つを使用する。

【０３３４】

幾つかの実施形態において、記憶装置（４１５）は、本明細書に記載される装置、システム、又は方法の動作に関連したファイル又はデータを保存する。

【０３３５】

幾つかの実施形態において、サーバーは、ネットワーク（４３０）を介して１以上のリモートコンピュータシステムと通信する。幾つかの実施形態において、１以上のリモートコンピュータシステムは、例えば、パーソナルコンピュータ、ラップトップ、タブレット、電話、スマートフォン、又は携帯情報端末を含む。

【０３３６】

幾つかの実施形態において、制御組立体は単一のサーバー（４０１）を含む。他の状況において、システムは、イントラネット、エクストラネット、及び／又はインターネットを通じて互いに通信する複数のサーバーを含む。

【０３３７】

幾つかの実施形態において、サーバー（４０１）は、装置動作パラメータ、プロトコル、本明細書に記載される方法、及び潜在的な関連の他の情報を保存するのに適している。幾つかの実施形態において、そのような情報は、記憶装置（４１５）又はサーバー（４０１）に保存され、そのようなデータはネットワークを通じて送信される。

【０３３８】

特定の用語

他に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語及び科学用語は、請求される主題が属する技術分野における当業者によって、一般に理解されるものと同じ意味を有する。前述の一般的な記載及び次の詳細な記載は、典型的且つ例示的なものにすぎず、請求された任意の内容を限定するものではないことが理解される。本出願において、単数形の使用は、特に別記しない限り複数を含む。明細書と添付の特許請求の範囲に使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、他にその内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むということに留意しなければならない。本出願において、「又は」の使用は、特に明記しない限り、「及び／又は」を意味する。更に、用語「含むこと

（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の使用は、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、及び「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」といった他の形態と同じく、制限はない。

【０３３９】

本明細書で使用されるように、範囲及び量は、特定の値又は範囲の「約（ａｂｏｕｔ）」として表わすことができる。「約」は正確な量も含む。従って、「約５μＬ」は、「約５μＬ」及び「５μＬ」も意味する。通常、用語「約」は、実験誤差内にあると予想される量を含む。

【０３４０】

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のみのためのものであり、記載される主題を限定すると解釈されるものではない。

【０３４１】

本明細書で使用されるように、用語「タンパク質」は、完全長のシステインを含有するタンパク質、完全長の機能的システインを含有するタンパク質、システイン含有タンパク質の断片、又は機能的に活性なシステイン含有タンパク質の断片を包含している。幾つかの例において、本明細書に記載されるタンパク質はまた、「単離されたタンパク質」、或いは、誘導の起源又は源が理由で、その未変性の状態で付随する自然に結合する成分とは結合せず；同じ種から他のタンパク質を実質的に含まず；異なる種の細胞により発現され；又は、自然に生じない、タンパク質としても称される。

【０３４２】

本明細書で使用されるように、用語「ポリペプチド」は、アミノ酸の任意の重合鎖を指す。用語「ポリペプチド」は、未変性又は修飾されたシステイン含有タンパク質、システイン含有タンパク質の断片、或いは、非天然のアミノ酸残基を含むポリペプチドアナログを包含する。幾つかの例において、ポリペプチドは単量体である。幾つかの例において、ポリペプチドは重合体である。幾つかの例において、本明細書に記載されるポリペプチドはまた、「単離されたポリペプチド」、或いは、誘導の起源又は源が理由で、その未変性の状態で付随する自然に結合する成分とは結合せず；同じ種から他のタンパク質を実質的に含まず；異なる種の細胞により発現され；又は、自然に生じない、ポリペプチドとしても称される。

【０３４３】

本明細書で使用されるように、用語「個体」、「被験体」、及び「患者」は、任意の哺乳動物を意味する。幾つかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。幾つかの実施形態では、哺乳動物はヒトではない。どの用語も、保健従事者（例えば、医師、正看護士、ナース・プラクティショナー、医師助手、用務係、又はホスピス職員）の監督（例えば、持続的又は断続的）によって特徴付けられた状況を要求せず、又はそれに限定されない。

【０３４４】

本明細書で使用されるように、用語「アルキル」は、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓ－ブチル、ｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ｓ－ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、アイコシル、テトラコシルなどの、１～２４の炭素原子の分枝した又は分枝していない飽和炭化水素基である。アルキル基は非環式であることが理解される。幾つかの例において、アルキル基は分子している、又は分枝していない。幾つかの例において、アルキル基はまた置換されている、又は置換されていない。例えば、アルキル基は、アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ニトロ、シリル、スルホ－オキソ、又はチオールを含むがこれらに限定されない、１以上の基で置換される。「低級アルキル」基は、１～６（例えば１～４）の炭素原子を含有するアルキル基である。幾つかの例において、アルキル基という用語はまた、Ｃ１アルキル、Ｃ１－Ｃ２アルキル、Ｃ１－Ｃ３アルキル、Ｃ１－Ｃ４アルキル、Ｃ１－０５アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ７アルキル、Ｃ１－Ｃ８

アルキル、Ｃ１－Ｃ９アルキル、Ｃ１－Ｃ１０アルキルなど、最大でＣ１－Ｃ２４アルキルまでである。

【０３４５】

本明細書で使用されるように、用語「アリール」は、ベンゼン、ナフタレン、フェニル、ビフェニル、アントラセンなどを含むがこれらに限定されない、任意の炭素ベースの芳香族基を含有する基である。アリール基は置換される場合もあれば、置換されない場合もある。幾つかの例において、アリール基は、アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、－NH_2、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、アジド、ニトロ、シリル、スルホ－オキソ、又はチオールを含むがこれらに限定されない、１以上の基で置換される。用語「ビアリール」は、アリール基の特定型式であり、「アリール」の定義に含まれている。加えて、アリール基は随意に単環構造であり、或いは、融合環構造であるか又は炭素炭素結合などの１以上の架橋基を介して結合される多環構造を含んでいる。例えば、ビアリールは、ナフタレンにおけるような融合環構造を介して共に結合される、又は、ビフェニルにおけるような１以上の炭素炭素結合を介して結合される、２つのアリール基を指す。

【実施例】

【０３４６】

これら実施例は、例示目的のためのみに提供され、本明細書で提供される請求項の範囲を制限するものではない。

【０３４７】

実施例１

生物学的方法

ヒト癌細胞株のプロテオームの調製

細胞株を全てＡＴＣＣから得て、少ない継代数と共に使用して、５％のCO_2で３７℃で成長させた。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞及びＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を、１０％のウシ胎仔血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、及びグルタミンで補足されたＤＭＥＭの中で成長させた。Ｊｕｒｋａｔ、Ｒａｍｏｓ、及びＭＵＭ２Ｃの細胞を、１０％のウシ胎仔血清、ペニシリン、及びストレプトマイシンで補足されたＲＰＭＩ－１６４０培地の中で成長させた。インビトロでの標識化のために、細胞を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞に対しては１００％のコンフルエンスまで成長させ、或いは、Ｒａｍｏｓ又はＪｕｒｋａｔの細胞に対しては細胞密度が１５０万個の細胞／ｍＬに到達するまで成長させた。細胞を冷たいＰＢＳで洗浄し、冷たいＰＢＳでこすり、細胞ペレットを遠心分離（１，４００ｇ、３分、４℃）により単離して、使用するまで－８０℃で保存した。細胞ペレットを超音波処理により溶解し、分画して（１００，０００ｇ、４５分）、可溶性及び膜画分をもたらして、その後、これらを、プロテオミクス実験のために１．５ｍｇ／ｍＬの最終タンパク濃度、及びゲルベースのＡＢＰＰ実験のために１ｍｇ／ｍＬに調整した。可溶性の溶解物を、各実験の前に凍結させたペレットから直接、新たに調製した。タンパク濃度を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＤＣ（商標）タンパク質アッセイキットを使用して判定した。

【０３４８】

ＩＡ－ローダミン及びＡｃ－Ｒｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示される「ＤＥＶＤ」）でのゲルベースのＡＢＰＰによる断片求電子ライブラリーのスクリーニング

２５μＬの可溶性のプロテオーム（１ｍｇ／ｍＬ）を、１時間周囲温度で、断片求電子（ＤＭＳＯ中で１μＬの２５倍の保存溶液）で処理した。その後、ＩＡ－ローダミン（２５μＭの１μＬ、最終濃度＝１μＭ）を加え、更に１時間反応させた。反応物を、８μＬの４倍のＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファーでクエンチし、クエンチしたサンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１０％のポリアクリルアミド；１つのレーンにつき１５μＬのサンプル）により分析し、平台の蛍光スキャナー（ＢｉｏＲａｄ　ＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰ又はＨｉｔａｃｈｉ　ＦＭＢｉｏ　Ｈｅ）を使用してゲル内蛍光により視覚化した。

大腸菌の中で発現された組換え型タンパク質の標識化を測定するために、精製されたタンパク質を可溶性のプロテオームに加えて、１μＭ（ＣＡＳＰ８、ＰＲＭＴ１、ＥＶＩＰＤＨ２）、２μＭ（ＴＩＧＡＲ、ＩＤＨ１）、又は４μＭ（ＩＤＨ１　Ｒ１３２Ｈ）の最終濃度とし、プロテオームを上述のように処理した。Ｒａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔの可溶性プロテオームと比較すると、ＩＡ－ローダミンによるＩＤＨ１の標識化の方が、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１の可溶性プロテオームにおいて比較的優れている。可溶性プロテオーム中の組換え型の活性ＣＡＳＰ８を、Ｒｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（５０μＭの１μＬ、最終濃度＝２μＭ）で標識し、クエンチし、１４％のポリアクリルアミドゲル上でのＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。

【０３４９】

アルキン含有のクリックプローブでのゲルベースのＡＢＰＰ

２５μＬの可溶性プロテオーム（１ｍｇ／ｍＬ）を、周囲温度で１時間、１８又は１９の示された濃度（ＤＭＳＯ中で１μＬの２５倍の保存溶液）で標識し、その後、ローダミン－アジドへの銅触媒のアジド－アルキン環化付加（ＣｕＡＡＣ）の結合にさらした。ＣｕＡＡＣを、２０μＭのローダミン－アジド（ＤＭＳＯ中で５０倍の保存溶液（ｓｔｏｃｋ））、１ｍＭのトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ；水中で新鮮な５０倍の保存溶液、最終濃度＝１ｍＭ）、リガンド（ＤＭＳＯ中で１７倍の保存溶液：ｔ－ブタノール１：４、最終濃度＝１００μＭ）、及び１ｍＭの$CuSO_4$（水中で５０倍の保存溶液、最終濃度＝１ｍＭ）で実行した。サンプルを、８μＬの４倍のＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファーでクエンチする前に、周囲温度で１時間反応させた。クエンチした反応物をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、ゲル内蛍光により視覚化した。ＣＡＳＰ８とＩＭＰＤＨ２のために、ＩＭＰＤＨ２又はＰｒｏ－ＣＡＳＰ８（それぞれ１μＭ）を含む２５μＬの可溶性プロテオームを、示された断片により処理し、その後、ＩＭＰＤＨ２については１８（６２５μＭの１μｌ、最終濃度＝２５μＭ）、又はＣＡＳＰ８については６１（６２５μＭの１μｌ、最終濃度＝２５μＭ）で１時間、インキュベーションを行った。ＭＬＴＫのために、$MTLK^2$を安定して過剰発現するＨＥＫ　２９３Ｔ細胞を１時間、示された断片求電子で処理し、その後、１時間にわたり５９（１２５μＭの１μｌ、最終濃度＝５μＭ）での標識化を行った。これらは、ローダミンーアジドへのＣｕＡＡＣ結合、及び上述のようなＳＤＳ－ＰＡＧＥによる評価の後に行われた。

【０３５０】

インビトロのIC_{50}値の判定

示されたタンパク質を含有する２５μＬのプロテオームを、１時間周囲温度で断片求電子により処理し、１時間にわたり上述のプローブで標識し、クエンチし、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びゲル内蛍光視覚化（ｎ＝３）により分析した。ＩＡ－ローダミンを、Ｃ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲ、Ｃ４０９Ｓ－ＣＡＳＰ８、及びＰＲＭＴ１のためのプローブとして使用した。５９を、ＭＬＴＫのためのプローブとして使用した。ＩＭＰＤＨ２を含有する可溶性プロテオームを１５分間ＡＴＰで処理し、その後、１時間にわたり１８（６２５μＭの１μｌ、最終濃度＝２５μＭ）でのインキュベーションを行った。ＭＬＴＫとＩＭＰＤＨ２を、上述のようなローダミンーアジドへのＣｕＡＡＣ結合にさらした。標識化のパーセンテージを、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して帯（ｂａｎｄｓ）の統合された光学強度を定量化することにより判定した。非線形回帰分析を用いて、ＧｒａｐｈＰａｄプリズム６を使用して生成された用量－反応曲線からIC_{50}値を判定した。

【０３５１】

ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰサンプルの調製

インサイツの標識化のために、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を９５％のコンフルエンスに成長させ、Ｒａｍｏｓ細胞を１００万個の細胞／ｍＬに成長させた。全てのサンプルにおける培地を、２００μＭの示された断片を含む新鮮な培地と交換し、細胞を３７℃で２時間インキュベートし、冷たいＰＢＳで洗浄し、冷たいＰＢＳでこすり、遠心分離により収集した（以前の「ヒト癌細胞株のプロテオームの調製」のセクションを参照）。

【０３５２】

断片２、３、８、９、１０、１２、１３、１４、２１、２７、２８、２９、３１、３３、３８、４５、５１、及び５６を、インサイツで２００μＭでスクリーニングした。断片４及び１１を、インサイツで１００μＭでスクリーニングした。断片２、３、８、及び２０を、インサイツで５０μＭで試験した。

【０３５３】

インビトロ又はインサイツでの断片の処理後、サンプルを、１００μＭのヨードアセトアミドアルキン（ＩＡアルキン、ＤＭＳＯ中で１０ｍＭの保存溶液の５μＬ）により、周囲温度で１時間、標識した。６１での直接的な標識化のために、６１（ＤＭＳＯ中で１又は１０ｍＭの保存溶液の５μＬ、最終濃度＝１０又は１００μＭ）を、ＩＡ－アルキンの代わりに用いた。サンプルを、ＣｕＡＡＣにより、上述のような軽（断片処理）又は重（ＤＭＳＯ処理）ＴＥＶタグ（ＤＭＳＯ中で５ｍＭの保存溶液の１０μＬ、最終濃度＝１００μＭ）、ＴＣＥＰ、ＴＢＴＡリガンド、及び$CuSO_4$に結合させた。サンプルを１時間反応させ、その時点でサンプルを遠心分離させた（１６，０００ｇ、５分、４℃）。結果として生じるペレットを、氷冷のメタノール（５００μＬ）の中で超音波処理し、次に、再懸濁させた軽及び重の標識されたサンプルを組み合わせ、遠心分離した（１６，０００ｇ、５分、４℃）。ペレットを、超音波処理及び加熱（５分、９５℃）で１．２％のＳＤＳを含むＰＢＳ（１ｍＬ）の中で可溶化し、任意の不溶性物質を、周囲温度での追加の遠心分離工程（１４，０００ｇ、１分）により取り除いた。

【０３５４】

各サンプルについて、１００μＬのストレプトアビジン－アガロースビーズスラリー（Ｐｉｅｒｃｅ）を、１０ｍＬのＰＢＳの中で洗浄し、次に５ｍＬのＰＢＳの中で再懸濁した。ＳＤＳで可溶化されたタンパク質を、ストレプトアビジンアガロースビーズの懸濁液に加え、ビーズ混合物を周囲温度で３時間回転させた。インキュベーション後、ビーズを遠心分離（１，４００ｇ、３分）によりペレット状にし、洗浄した（２×１０ｍＬのＰＢＳ及び２×１０ｍＬの水）。

【０３５５】

ビーズを、１ｍＬのＰＢＳを含むｅｐｐｅｎｄｏｒｆチューブに移し、遠心分離し（１，４００ｇ、３分）、６Ｍの尿素を含むＰＢＳ（５００μＬ）の中で再懸濁した。これに、１０ｍＭのＤＴＴ（水中で２００ｍＭの保存溶液の２５μＬ）を加え、ビーズを６５℃で１５分間インキュベートした。その後、２０ｍＭのヨードアセトアミド（水中で４００ｍＭの保存溶液の２５μＬ）を加え、振盪により３７℃で３０分間反応させた。ビーズ混合物を９００μＬのＰＢＳで希釈し、遠心分離（１，４００ｇ、３分）によりペレット状にし、２００μＬのＰＢＳの中で再懸濁した。これに、１ｍＭの$CaCl_2$（水中で２００ｍＭの保存溶液の２μＬ）、及びトリプシン（２μｇ、Ｐｒｏｍｅｇａ、ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｇｒａｄｅ）を加え、振盪により３７℃で一晩、消化を進めた。ビーズを、遠心分離（１，０００ｇ、１分）によるＭｉｃｒｏ　Ｂｉｏ－Ｓｐｉｎ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で消化物から分離し、洗浄し（２×１ｍＬのＰＢＳ及び２×１ｍＬの水）、次いで１ｍＬの水を含む新鮮なｅｐｐｅｎｄｏｒｆに移した。洗浄したビーズを、１４０μＬのＴＥＶ緩衝液（５０ｍＭのトリス、ｐＨ８、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＤＴＴ）の中でもう１回洗浄し、次に１４０μＬのＴＥＶ緩衝液の中で再懸濁した。５μＬのＴＥＶプロテアーゼ（８０μＭ）を加え、反応物を２９℃で一晩回転させた。ＴＥＶ消化物を、遠心分離（１，４００ｇ、３分）によるＭｉｃｒｏ　Ｂｉｏ－Ｓｐｉｎカラムでビーズから分離し、ビーズを水（１００μＬ）で１回洗浄した。その後、サンプルを、５％（ｖ／ｖ）のギ酸の最終濃度へと酸性化し、分析前に－８０℃で保存した。

【０３５６】

ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰサンプルの液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）

ＴＥＶ消化物を、Ｃ１８樹脂（Ａｑｕａ　５μｍ、Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を詰めた２５０μｍ（内径）の石英ガラスキャピラリーカラムの上に載せ、圧力を加えた。サンプルを、Ａｇｉｌｅｎｔ　１２００シリーズのクォータナリーポンプ（ｑｕａｔｅｒｎａｒｙ　ｐｕｍｐ）につないだＬＴＱ－Ｖｅｌｏｓ　Ｏｒｂｉｔｒａｐ質量分析計（Ｔｈｅｒｍ

ｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、多次元の液体クロマトグラフィータンデム型質量分析（ＭｕｄＰＩＴ）により分析した。Ｗｅｅｒａｐａｎａ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ　２：１４１４－１４２５　（２００７）に記載されるように、ペプチドを、５００ｍＭの水性酢酸アンモニウムの０％、３０％、６０％、９０％、及び１００％の塩隆起（ｓａｌｔ　ｂｕｍｐｓ）を使用して、又は緩衝液Ａにおける５－１００％の緩衝液Ｂの勾配（緩衝液Ａ：９５％の水、５％のアセトニトリル、０．１％のギ酸；緩衝液Ｂ：５％の水、９５％のアセトニトリル、０．１％のギ酸））を使用して、５つの工程のＭｕｄＰＩＴ実験において、５μｍのチップ（１００μｍの石英ガラス、Ｃ１８（１０ｃｍ）、及びかさ高い強固なカチオン交換樹脂（３ｃｍ、ＳＣＸ、Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ））を含む二相のカラムの上に溶出させた。データ依存の獲得モードでデータを収集し、ダイナミックエクスクルージョン（ｄｙｎａｍｉｃ　ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ）が可能になった（２０ｓ、２回の繰り返し）。１つの完全なＭＳ（ＭＳ１）スキャン（４００－１８００ｍ／ｚ）、その後、ｎ番目の最も豊富なイオンの３０　ＭＳ２スキャン（ＩＴＭＳ）を行った。

【０３５７】

ペプチド及びタンパク質の同定

ＭＳ２スペクトルデータを、ＲＡＷ　Ｘｔｒａｃｔｏｒ（バージョン１．９．９．２；ｈｔｔｐ：／／ｆｉｅｌｄｓ．ｓｃｒｉｐｐｓ．ｅｄｕ／ｄｏｗｎｌｏａｄｓ．ｐｈｐで利用可能）を使用して未加工のファイルから抽出した。ＭＳ２スペクトルデータを、ヒトのＵｎｉＰｒｏｔデータベース（ｒｅｌｅａｓｅ－２０１２＿１１）の逆連鎖状の（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｃｏｎｃａｔｅｎａｔｅｄ）非冗長性の変異体を用いた、ＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｆｉｅｌｄｓ．ｓｃｒｉｐｐｓ．ｅｄｕ／ｄｏｗｎｌｏａｄｓ．ｐｈｐで公に利用可能）を使用して探索した。システイン残基を、カルボキサミドメチル化のための静的な修飾により（＋５７．０２１４６）、及び、軽又は重のＴＥＶタグ（それぞれ＋４６４．２８５９５又は＋４７０．２９９７６）の何れかのための最大１つの特異な修飾により探索した。ペプチドは、少なくとも１つのトリプシン末端を有し、且つＴＥＶ修飾を含むことを要求される。ＰｒｏＬｕＣＩＤデータをＤＴＡＳｅｌｅｃｔ（バージョン２．０）に通して濾過し、１％未満のペプチド無病誤診率を達成した。

【０３５８】

Ｒ値の算出及び処理

各固有のペプチド（ＤＭＳＯ／化合物処理；ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰの比率、Ｒ値）の重／軽の比率を、デフォルトパラメータ（１つのピークにつき３ｍｓ１ｓ及び信号対雑音の閾値２．５）を使用してインハウスの（ｉｎ－ｈｏｕｓｅ）ＣＩＭＡＧＥソフトウェアで定量化した。求電子の断片の部位特異的な結合（ｅｎｇａｇｅｍｅｎｔ）を、ＩＡ－アルキンプローブの標識化の遮断により評価した。ＤＭＳＯで処置したプロテオーム（重ＴＥＶタグ）と比べて、断片で処理したプロテオーム（軽ＴＥＶタグ）からのＭＳ１ピーク面積において≧９５％の減少を示したペプチドについて、２０の最大の比率を割り当てた。固有のペプチドの侵入のための比率を、各実験のために計算し；同じ修飾されたシステイン（例えば、異なる荷電状態、ＭｕｄＰＩＴクロマトグラフィーの工程、又はトリプシンの末端）でのペプチドの重複を１つにまとめ、中央の比率を最終的な比率（Ｒ）として報告した。ＣＩＭＡＧＥにより報告されたペプチドの比率を更にフィルタ処理して、個々のデータセットにおける低品質比率の除去又は補正を確実にした。適用される品質フィルタは以下のとおりであった：トリプシンペプチドの半分の除去；中央（中央の９０％以上）からの高い標準偏差との比率のために、最低の比率を中央の代わりに取り入れた；Ｒ＝２０を備えたペプチドの除去、及び親イオンの溶出中に引き起こされる単一のｍｓ２事象のみ；２０の比率を持つ全てのペプチドのマニュアルアノテーション、以前のキュレーション工程の後に残った低品質溶出プロファイルを持つ任意のペプチドの除去。個々の断片に対するプロテオームの反応値を、各複製実験試験のためのＲ値≧４（リガンド結合したシステイン（ｌｉｇａｎｄｅｄ　ｃｙｓｔｅｉｎｅｓ）として定義される）を含む合計の定量化されたシステイン含有ペプチドのパーセンテージとして計算し、最終のプロテオー

ム反応値を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１及びＲａｍｏｓの細胞プロテオームの両方からの各断片の全ての複製実験のための平均として計算する。

【０３５９】

クロスデータ処理

標準偏差が平均の６０％未満であった場合、同じ化合物及び細胞株の生物学的な複製を平均化し；そうでなければ、比率のセットの最低値を得た。複数の修飾されたシステインを含むペプチドについて、最多数の定量化事象でのシステインを維持し、残りの冗長なペプチドを捨てた。総計のデータセット（更なる生物情報科学及び統計分析のために使用されたもの）に含まれるペプチドは、３つの実験において定量化されていることが求められた。システインに少なくとも２つの比率Ｒ≧４（ヒット断片）、及び０．５と２の間の１つの比率（対照断片）がある場合、システインはリガンドと分類される。大多数（断片の＞７５％）は少なくとも２つの生物学的な複製において特性を明らかにされるが、単一の複製のＭＳ実験からのデータの一部が含まれていた。全ての断片についての平均化されたフィルタ処理したデータ、及び代表的な個々のフィルタ処理したデータセットは、表１－３に見出される。

【０３６０】

インサイツのデータ処理

Ｒ値を計算し、個々のデータセットを上述（Ｒ値の算出及び処理）のようにフィルタ処理した。インサイツでのヒットの２つの分類を定めた：１）インビトロでヒットとしても観察された、インサイツでリガンド結合されるシステイン、及び、２）インビトロで検出されるがインサイツでのみリガンド結合されるシステイン。第１の分類について、インビトロ及びインサイツでの実験からの同じシステイン含有ペプチドのＲ値を比較し、両方に比率Ｒ≧４がある場合、システインはインサイツでリガンド結合可能であると考慮される。第２の分類について適格化するために、２つの異なる断片の複製のための２つの比率Ｒ≧４はインサイツで検出されることを求められ、これらの断片の少なくとも１つは、インビトロでＲ≦２を持つ非ヒット（ｎｏｎ－ｈｉｔ）として定量化されねばならない。加えて、同じタンパク質からの別のシステインは、断片の競合からではなく断片の処置後のタンパク質発現の変化からＲ値において変わる可能性を制御するために、同じ断片によりインサイツでリガンド結合されない（Ｒ≦２）であることを求められた。

【０３６１】

リガンド結合されたシステインの機能アノテーション

カスタムのｐｙｔｈｏｎ　ｓｃｒｉｐｔを使用して、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｋｎｏｗｌｅｄｇｅのデータベース（ｒｅｌｅａｓｅ－２０１２＿１１）において利用可能な機能アノテーションをコンパイルした。関連するＵｎｉｐｒｏｔのエントリーを、残りの残基での利用可能な機能アノテーション、特に酵素触媒残基（活性部位）、ジスルフィド（レドックス活性及び構造的）、及び金属結合部位のために引き出した（ｍｉｎｅｄ）。リガンド結合されたタンパク質を、Ｄｒｕｇｂａｎｋのデータベース（バージョン４．２）に対して問い合わせ、ＤｒｕｇＢａｎｋ及び非Ｄｒｕｇｂａｎｋのタンパク質へと分画した。タンパク質レベルで割り当てられる機能的なキーワードを、Ｕｎｉｐｒｏｔのデータベース殻収集し、Ｄｒｕｇｂａｎｋ及び非Ｄｒｕｇｂａｎｋの分類をタンパク質の機能別の区分へと更に分類した。システイン反応データを、上述（ペプチド及びタンパク質の同定）のようにＰｒｏＬｕＣＩＤを使用して再処理した。反応及びリガンド結合可能性のデータセット両方に見出されるシステインを、それらの反応値（より低い比率はより高い反応を示す）に基づいて選別した。各反応ビン（刻み幅５０）内の合計のリガンド結合されたシステインのパーセンテージの移動平均を得た。カスタムのｐｙｔｈｏｎ　ｓｃｒｉｐｔを開発して、ＲＣＳＢ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）から関連するＮＭＲ及びＸ線の構造を収集した。利用可能なＰＤＢ構造のないタンパク質について、ＰＤＢにおいて堆積されるタンパク質に対してＢＬＡＳＴで実行される配列アラインメントを使用して、構造的な相同体を同定した。活性部位及び非活性システインのアノテーションについて、ＰＤＢにおける構造を含む酵素を手で

検査して、システインの位置を評価した。システインは、１０Åの活性部位のリガンド又は残基内にある場合、酵素活性部位に存在すると考慮された。１０Åの範囲の外側のシステインを、非活性部位の残基であると考えた。高い被覆率、リガンド結合可能なシステイン、活性部位及び非活性部位のシステインにわたる断片のヒット率のヒストグラムを、１０以上の別個の実験において定量化されたリガンド結合可能なシステインの亜群から計算した。断片のヒット率を、Ｒ≧４での合計の定量化事象のパーセンテージとして報告する。ヒストグラム及びヒートマップを含む全体のデータ内の傾向の分析のために、細胞株混合データセットを使用し、ここで、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１実験からのデータを得て、特定の断片及びシステインについてのＭＤＡ－ＭＢ－２３１実験からのデータが無い場合、第１及びＲａｍｏｓのデータを使用した。ヒートマップを、ヒートマップ２アルゴリズムを使用してＲ（バージョン３．１．３）において生成した。タンパク質構造を、Ｐｙｍｏｌを使用して再現した。

【０３６２】

ＧＳＨ反応

グルタチオン（ＧＳＨ）を、アッセイ緩衝液（１００ｍＭのトリス、ｐＨ８．８、共溶媒として１０％のエタノール）において１２５μＭの最終濃度に希釈した。三通りで、透明な９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ（登録商標）Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標））中の１００μＬのＧＳＨ混合物に、示された求電子（ＤＭＳＯ中で５０ｍＭ保存溶液の２μＬ、最終濃度＝５００μＭ）を加え、反応混合物を室温で１時間インキュベートした。５μＬのＥｌｌｍａｎ試薬（１Ｍ　ＮａＯＨ中で１００ｍＭの保存溶液、最終濃度＝５ｍＭ）を加え、吸収度をプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｆ５００）上で４４０ｎｍで測定した。残りのＧＳＨの濃度を標準曲線から計算した。

【０３６３】

反応的なシステインドッキング（ｃｙｓｔｅｉｎｅ　ｄｏｃｋｉｎｇ）

図３からのクロルアセトアミド及びアクリルアミドの断片を全て含む、インシリコの断片ライブラリーを、カスタムのＰｙｔｈｏｎ　ｓｃｒｉｐｔを備えたＯｐｅｎ　Ｂａｂｅｌライブラリーを使用して調製した。断片を、それらの反応型（即ち、明確なクロルアセトアミド及びアクリルアミドの頭部（ｗａｒｈｅａｄｓ）を備える）でモデル化した。３Ｄ座標をＳＭＩＬＥＳのストリングから生成し、ｐＨ７．４でそれらのプロトン化状態を計算し、次いでＭＭＦ９４ｓの力場（５０Ｋの反復の最も急勾配の降下；９０Ｋの結合勾配）を使用してそれらを最小限にし；不確定の構成を持つキラル分子について、全てのエナンチオマーを精製し、合計５３の断片を結果としてもたらした。

【０３６４】

各タンパク質について、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ　ＩＤを使用し、ＰＤＢをフィルタ処理した。Ｘ線結晶学により判定される構造を選択し、より高い配列被覆率及び構造分解能をもたらす（ｐｒｉｖｉｌｅｇｉｎｇ）（選択されたＰＤＢ　ＩＤについて表５を参照）。ヒトの構造が利用可能ではない時、利用可能な最も同族に近い生物を選択した（例えば、ＰＲＭＴ１：Ｒ．ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）。タンパク質構造を、標準のＡｕｔｏＤｏｃｋプロトコルに従い調製した。水、塩、及び結晶学的な添加剤を取り除き；ＡｕｔｏＤｏｃｋＴｏｏｌを使用し、水素を加えて、Ｇａｓｔｅｉｇｅｒ－Ｍａｒｓｉｌｉ電荷を計算し、ＰＤＢＱＴファイルを生成した。

【０３６５】

ＭＳＭＳを減らした表面の方法（ＭＳＭＳ　ｒｅｄｕｃｅｄ　ｓｕｒｆａｃｅ　ｍｅｔｈｏｄ）を使用して、アクセス可能なシステインを同定した。タンパク質量を、１．５Åのプローブ範囲を使用してスキャンし；残基は、外部表面又は内部空洞の何れかと接する少なくとも１つの原子がある場合、アクセス可能であると考慮された。

【０３６６】

断片のライブラリーを、ＡｕｔｏＤｏｃｋ　４．２を使用して個々のアクセス可能なシステイン上で独立してドッキングさせた。２４．４×２４．４×２４．４Åのグリッドボックスを、残基の幾何学的中心に収集し；チオール水素を側鎖から取り除き、これをドッ

キング中に可撓性のものとしてモデル化し；構造の残りを固く保った。カスタムの１３－７相互作用電位を、リガンドにおいて求核性の硫黄と反応的な炭素との間で定めた。平衡距離（r_{eq}）を、Ｃ－Ｓ共有結合の長さ（１．８Å）に設定し；潜在的なウェルの深さ（ε_{eq}）は１．０と０．１７５の間で変動し、異なるリガンドの反応へとモデル化した。各断片のために、潜在的なウェルの深さを、そのプロテオミクス反応のパーセンテージを２０で割ることにより判定し、ヨードアセトアミドの値を参考のために最大（２．５）として近似させた。潜在性を、ＡｕｔｏＤｏｃｋの力場の表の修正により実施した。断片を制約無しでドッキングし、デフォルトＧＡ設定を使用して１００のポーズを生成した。各断片について、最良のドッキングのスコアのポーズを分析し：求核性の硫黄と反応的な炭素との間の距離が≦２．０Åであった場合、システインは共有結合的に修飾されると考慮された。残基は、少なくとも１つのリガンドによりアルキル化された場合、標識されたと考慮された。ドッキングのスコア（即ち、負の結合エネルギー）を、そのドッキングしたポーズにおける各断片の推定された相互作用エネルギーに基づいて計算した。最良のアルキル化断片のドッキングのスコアを、標識化スコアとして定めた。最良の標識化スコアを持つ残基は、最も標識される可能性が高いものとして考慮された。

【０３６７】

構造のモデリング

Ｂａｔｅｍａｎドメインを含むＩＭＰＤＨ２構造を、Ｉ－ＴＡＳＳＥＲを使用してモデル化した。

【０３６８】

サブクローン化及び突然変異生成

ＩＤＨ１（Ｏｐｅｎ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃｌｏｎｅ ＩＤ：３８８０３３１）及びＩＭＰＤＨ２（Ｏｐｅｎ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃｌｏｎｅ ＩＤ：３４４７９９４）をコードする完全長のｃＤＮＡを、Ｃ末端His_6－アフィニティータグ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８６１）によりｐＥＴ２２ｂ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ）へとサブクローン化した。ＴＩＧＡＲ（Ｏｒｉｇｅｎｅ，Ｓｃ３２０７９４）をコードする完全長のｃＤＮＡを、Ｎ末端His_6－アフィニティータグ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８６１）によりｐＥＴ２８ａ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ）へとサブクローン化した。ｐＥＴ４５ｂ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ）へとサブクローン化された完全長のＰＲＭＴ１は、Ｃｒａｖａｔｔ ｌａｂにより以前に制された。完全長のヒトＣＡＳＰ３（残基１－２７７）及びＣＡＲＤドメインの無い切断型ＣＡＳＰ８（残基２１７－４７９）を、Ｃ末端His_6－アフィニティータグ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８６１）によりｐＥＴ２３ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ）へとサブクローン化した。システイン突然変異体を、所望の突然変異及びそれぞれの補体（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔｓ）を含むプライマーを使用する、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅの部位特異的突然変異誘発を使用して生成した。

【０３６９】

ＴＩＧＡＲ、ＩＤＨ１、ＰＲＭＴ１、及びＩＭＰＤＨ２の組換え型の過剰発現

ＴＩＧＡＲ、ＩＤＨ１、ＰＲＭＴ１、及びＩＭＰＤＨ２を、０．８のOD_{600}へと、所望の抗生物質（５０μｇ／ｍＬのカナマイシン又は５０μｇ／ｍＬのカルベニシリン）で補足されたＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ上で成長させたＢＬ２１（ＤＥ３）化学的なコンピテント細胞（ＮＥＢ）の中で発現させ、１８℃で１６時間、０．５ｍＭのＩＰＴＧで誘導した。細胞を直ちに収集し、リゾチーム（Ｓｉｇｍａ）、デオキシリボヌクレアーゼ（ＮＥＢ）、及びｃＯｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤の錠剤（Ｒｏｃｈｅ）で補足した３０ｍＬの冷たい緩衝液Ａ（２５ｍＭのトリス、ｐＨ７．４、２００ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＢＭＥ）中で再懸濁させ、超音波で処理し、遠心分離機した（４５，０００ｇ、３０分、４℃）。可溶性画分を収集し、４℃で１ｍＬのＮｉ－ＮＴＡスラリー（Ｑｉａｇｅｎ）により１時間回転させた。その後、スラリーを５０ｍＬの量の溶融カラムに移し、重力流により収集した。その後、樹脂を、２０ｍＭのイミダゾールを含む１００ｍＬの緩衝液Ａで洗浄し、２００ｍＭのイミダゾールを含む１０ｍＬ緩衝液Ａで溶出した。溶出剤を、２．５ｍＬ（Ａｍｉｃｏｎ－Ｕｌｔｒａ－１５、１０ｋＤａ

のMWカットオフ）に濃縮し、ＰＤ１０カラム（ＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ）を使用して緩衝液を貯蔵緩衝液（５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＢＭＥ）と交換し、更に濃縮して（Ａｍｉｃｏｎ－Ｕｌｔｒａ－４、１０ｋＤａのMWカットオフ）、およそ１００μＭのタンパク質の最終濃度とした。タンパク濃度を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＤＣ（商標）タンパク質アッセイキットを使用して判定した。タンパク質純度を、還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、＞９５％の純度であった。

【０３７０】

組換え型のＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ８、及びＴＥＶプロテアーゼの発現

ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ８、プロＣＡＳＰ８（Ｄ３７４Ａ、Ｄ３８４Ａ）、及びＮ末端ＭＢＰ融合－His_6－ＴＥＶ－Arg_6プロテアーゼの構築物ｐＲＫ７９３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６１として開示された「His_6」、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６２として開示された「Arg_6」）を、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳ細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）の中で発現させた。細胞を、０．８－１．０のOD_{600}に対して、３７℃で２００μｇ／ｍｌのアンピシリン及び５０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールで補足された２ｘＹＴ培地の中で成長させた。カスパーゼの過剰発現を、３０℃で４時間０．２ｍＭのＩＰＴＧで（ＣＡＳＰ３）、１２℃で一晩（ＣＡＳＰ８）、又は３０℃で４時間０．５ｍＭのＩＰＴＧで（ＴＥＶプロテアーゼ）、誘導した。細胞を直ちに収集し、氷冷の緩衝液Ａ（カスパーゼ：１００ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、１００ｍＭのＮａＣｌ；ＴＥＶプロテアーゼ：ＰＢＳ）の中で再懸濁し、微少溶液操作（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）により溶解の３つのサイクルにさらした。細胞溶解物を遠心分離（４５，０００ｇ、３０分、４℃）により明確にし、可溶性画分を、緩衝液Ａで予め平衡に保ち且つ２００ｍＭのイミダゾールを含む緩衝液Ａで溶出される１ｍＬのＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰ　Ｎｉ－ＮＴＡアフィニティカラム（ＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ）に充填した。溶出されたタンパク質を、緩衝液Ｂ（２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０）で直ちに２倍に希釈し、１ＭのＮａＣｌを含む緩衝液Ｂの５０％まで、３０カラムの量の勾配での陰イオン交換クロマトグラフィー（ＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰ、ＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ）により精製した。緩衝液の交換及び任意の残りの汚染物質の除去のために、緩衝液Ｃ（カスパーゼ：２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、５０ｍＭのＮａＣｌ；ＴＥＶプロテアーゼ：ＰＢＳ、１０ｍＭのＤＴＴ）において、カスパーゼをＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１６／６０ゲル濾過カラム（ＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ）上で、及びＴＥＶプロテアーゼをＳｕｐｅｒｄｅｘ　７５ゲル濾過カラム（ＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ）上で注入した。所望のタンパク質を含む画分をプールし、およそ１ｍｇ／ｍＬ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｕｌｔｒａｆｒｅｅ－１５，　１０ｋＤａのMWカットオフ）に濃縮した。精製されたタンパク質を直ちに凍結し、－８０℃で保存した。タンパク質濃度を、変性条件においてＢｉｏ－Ｒａｄ比色測定法及びA_{280}の吸収度の両方を使用して測定した。タンパク質純度を、還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、＞９８％の純度であった。

【０３７１】

フラグタグを付けられたＩＤＨ１タンパク質のレトロウイルスの過剰発現

望まれない制限部位及びＧＦＰを除去するために、付加的なＫ３４５Ｋサイレント突然変異を含むＲ１３２Ｈ－ＩＤＨ１を、修飾したｐＣＬＮＣＸレトロウイルスベクターへとサブクローン化した。レトロウイルスを、ＨＥＫ－２９３ＲＴＶ細胞をトランスフェクトするために、１．５μｇの各ｐＣＬＮＣＸベクター、１．５μｇのｐＣＭＶ－ＶＳＶＧ、及び２０μＬのＲｏｃｈｅ　Ｘ－ｔｒｅｍｅＧｅｎｅＨＰ　ＤＮＡトランスフェクション試薬を得ることにより調製した。培地をトランスフェクションの１日後に交換し、翌日、培養物の上清を収集し、０．５μＭのフィルタに通して濾過した。所望のウイルスを含む１０ｍＬの濾液を使用して、４８時間にわたりポリブレン（８μｇ／ｍＬ）の存在下でＭＵＭ２Ｃ細胞を感染させ、その時点で、感染細胞を、７－１０日間１００μｇ／ｍＬのヒグロマイシンを含む培地において選択した。生存細胞を拡張し、ヒグロマイシンを含む完全なＲＰＭＩ－１６４０培地の中で培養した。

【０３７２】
ＩＤＨ１　ＮＡＤＰアッセイ
組換え型のＩＤＨ１及びＣ２６９Ｓ－ＩＤＨ１（貯蔵緩衝液において１００μＭ）を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１の細胞プロテオーム（１ｍｇ／ｍＬ）において１：２００に希釈した。２５μＬのこの混合物に、１μＬの示された化合物（ＤＭＳＯ中で２５倍の保存溶液）を加え、溶解物を透明な９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｃｏｓｔａｒ（登録商標））において室温で１時間、インキュベートした。ＩＤＨ１緩衝液（４０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４、２ｍＭの$MgCl_2$、０．０１％のプルロニック）中の、ＮＡＤＰ（１３．３ｍＭ）とイソシトラート（１３．３ｍＭ）との１つのウェルにつき７５μＬの保存溶液を、９６ウェルのＵＶ吸光度プレートリーダー（ＴＥＣＡＮ）上で、３４０ｎｍでＵＶ吸光度を測定する直前に加えた。吸収度は４５分間測定し、相対活性を、曲線の直線部分に関する吸収度の変化から計算した。
【０３７３】
ＩＤＨ１　２－ヒドロキシグルタラート（２－ＨＧ）形成アッセイ
ＩＤＨ１　Ｒ１３２Ｈを安定して過剰発現するＭＵＭ２Ｃ細胞を、１．５×10^6細胞／１５０ｍｍの皿に播種した。翌日、示された化合物（ＤＭＳＯ中で５０ｍＭの保存溶液）又はＤＭＳＯを細胞に加え、示された最終濃度とし、２時間インキュベートした。ＧＦＰを過剰発現する対照細胞を平行して処理した。細胞を氷冷ＰＢＳの中で洗浄し、氷冷ＰＢＳ及び遠心分離（１，４００ｇ、３分、４℃）においてこすることにより収集した。その後、細胞ペレットを１００μＬの氷冷ＰＢＳにおいて再懸濁し、その後、１０分間１６，０００ｇで超音波処理と遠心分離を行った。その後、溶解物を、０．５ｍＬのＺＥＢＡスピン脱塩カラム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ，　８９８８２）により、ＩＤＨ１緩衝液（４０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４、２ｍＭの$MgCl_2$）へと緩衝液交換した。タンパク質濃度を３．５ｍｇ／ｍＬに調整し、２５μＬの溶解物を２５μＬの反応混合物（ＩＤＨ１緩衝液中で２．５ｍＭのＮＡＤＰＨ及び２．５ｍＭのα－ケトグルタル酸塩）と混合し、反応を４時間にわたり進めて、その時点で反応混合物を５０μＬの冷たいメタノールでクエンチし、その後遠心分離（１６，０００ｇ、１０分、４℃）を行った。２－ＨＧの形成の後、標的とされたＬＣ／ＭＳ分析を行った。反応混合物を、移動相Ａ及びＢ（移動相Ａ：１００％のCH_3CN、０．１％のギ酸；移動相Ｂ：９５：５（ｖ／ｖ）H_2O：CH_3CN、５０ｍＭのNH_4OAc、０．２％のNH_4OH）の勾配を使用して、前置カラム（NH_2、４×３．０ｍｍ）を持つＬｕｎａ－NH_2カラム（５μｍ、１００Å、５０×４．６ｍｍ、Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）で分離した。流量は０．１ｍＬ／分で開始し、勾配は５分の０％のＢ、０．４ｍＬ／分の流量で２０分にわたり１００％のＢへの直線の増大、その後の、０．４ｍＬ／分（合計３０分）で０％のＢで３分間にわたり平衡化する前の、０．５ｍＬ／分で２分間にわたり１００％のＢの均一濃度の勾配から成る。各実行について、注入量は２５μＬであった。ＭＳ分析を、ＥＳＩのソースを持つＡｇｉｌｅｎｔ　Ｇ６４１０Ｂタンデム質量分析計上で行った。２－ＨＧのための滞留時間を１００ｍｓに設定した。また、２－ＨＧのための衝突エネルギーを５に設定した。キャピラリーを４ｋＶに設定し、フラグメンターを１００Ｖに設定した。乾燥ガス温度は３５０℃であり、乾燥ガスの流量は１１Ｌ／分であり、ネブライザー圧力は３５ｐｓｉであった。質量分析計をＭＲＭモードで実行し、２－ＨＧ（負のイオン化モード）について１４６．７～１２９のｍ／ｚの変化をモニタリングした。処理を３回繰り返して行った。発現細胞上の「模擬の」ＧＦＰから計算されたバックグラウンドの２－ＨＧ産生を、合計の２－ＨＧの産生から控除した。
【０３７４】
ＴＩＧＡＲ活性のアッセイ
Ｇｅｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｔｈｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ　４５８：４３９－４４８　（２０１４）に記載されるように、ＴＩＧＡＲ活性のアッセイを行った。２３ＢＰＧ（２，３－ビスホスホグリセラート）からの３ＰＧ（３－ホスホグリセラート）の産生の形成を、ＴＥＣＡＮプレートリーダー上で分光測光法により測定し、透

明で平底の９６ウェルのマイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｃｏｓｔａｒ（登録商標））において３４０ｎｍでの吸収度の減少を測定した。２μＬの組換え型のＴＩＧＡＲ（１０ｍｇ／ｍＬ）を、１ｍＬの希釈緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．１、２５ｍＭのＫＣｌ、１ｍＭの$MgCl_2$）に希釈した。２５μＬの希釈したタンパク質を、示された濃度の化合物（１μＬ、ＤＭＳＯ中で２５倍の保存溶液）で１時間インキュベートした。その後、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．１）、２５ｍＭのＫＣｌ、１ｍＭの$MgCl_2$、０．５ｍＭのＮＡＤＨ、１ｍＭのＤＴＴ、１ｍＭの２３ＢＰＧ、１ｍＭのＡＴＰ－Ｍｇ、１μＬの各ウサギの筋肉ＧＡＰＤＨの相当物（４０００の単位／ｍＬ、Ｓｉｇｍａ、Ｇ５５３７）、及び酵母ＰＧキナーゼ（６３００の単位／ｍＬ、Ｓｉｇｍａ、Ｐ７６３４）で構成される、７５μＬのアッセイ混合物を、タンパク質に加え、吸収度の減少を３４０ｎｍでモニタリングした。ＴＩＧＡＲを欠くサンプルから計算したバックグラウンドを、ＴＩＧＡＲを含むサンプルから控除した。実験を４回繰り返して実行した。

【０３７５】

ＰＲＭＴ１のインビトロでのメチル化のアッセイ

Ｗｅｅｒａｐａｎａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４６８：７９０－７９５（２０１０）に記載されるように、ＰＲＭＴ１アッセイを行った。２５μＬのメチル化緩衝液（２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、２００ｍＭのＮａＣｌ、０．４ｍＭのＥＤＴＡ）における組換え型のヒトＰＲＭＴ１（０．８５μＭ、野生型又はＣ１０１Ｓ突然変異体）を、１時間にわたり示された断片で予めインキュベートし、メチル化活性を、１ｍｇの組換え型のヒストン４（ＮＥＢ、Ｍ２５０４Ｓ）及び３Ｈ－ＳＡＭ（２μＣｉ）の追加後にモニタリングした。反応物を、周囲温度で６０分間にわたり更にインキュベートし、４×ＳＤＳサンプル緩衝液で止めた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを、１０％の酢酸／１０％のメタノール（ｖ／ｖ）で固定し、洗浄し、増幅試薬（Ａｍｅｒｓｈａｍ）でインキュベートした後、－８０℃で３日間、薄膜に曝した。

【０３７６】

ＭＬＴＫのインビトロでのキナーゼ活性のアッセイ

Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．ＡＣＳ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ ９：２１９４－２１９８（２０１４）に記載されるように、キナーゼ活性のアッセイプロトコルを行った。キナーゼアッセイ緩衝液、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）基質、及びＡＴＰ保存溶液を、ＳｉｇｎａｌＣｈｅｍから購入した。放射標識した［γ－^{33}Ｐ］ＡＴＰを、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒから購入した。ＷＴ、Ｃ２２Ａ、又はＫ４５Ｍ ＭＬＴＫを安定して過剰発現する、２５０μＬのＨＥＫ－２９３Ｔの可溶性の溶解物（８ｍｇ／ｍＬ）を、１００μＭの断片又はＤＭＳＯで１時間標識した。その後、サンプルを、１つのサンプル当たり２０μＬのフラグ樹脂のスラリーで個々に免疫沈殿させ、次に１５μＬの３×Ｆｌａｇ－ペプチドで溶出した。各サンプルに、５μＬのＭＢＰを加え、次に、５μＬの［γ－^{33}Ｐ］ＡＴＰアッセイカクテル（２５０μＭ、１６７μＣｉ／ｍＬ）を加え、キナーゼ反応を開始した。各反応混合物を周囲温度で３０分間インキュベートし、反応を、個々の予め切られたホスホセルロースＰ８１紙上に２５μＬの反応混合物の点を付けることにより終わらせた。点を付けたＰ８１紙片を、１０ｍＬの１％のリン酸（３×１０分）で洗浄した。ＭＬＴＫ活性を、シンチレーション計数器中にシンチレーション流体がある状態でＰ８１紙上の放射活性を数えることにより測定した。バックグラウンドを、Ｋ４５Ｍ－不活性突然変異体ＭＬＴＫ活性レベルから判定し、これをＷＴとＣ２２Ａのサンプルから控除した。ＷＴとＣ２２Ａのための相対活性を、それぞれのＤＭＳＯで処理したサンプルへ標準化した。実験を３回繰り返して実行した。

【０３７７】

ＣＡＳＰ３とＣＡＳＰ８のインビトロの活性のアッセイ

カスパーゼ３と８のアッセイを、製造業者の指示に従い、ＣＡＳＰ８活性のアッセイキット（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ，Ｋ１１２－１００）及びカスパーゼ３活性のアッセイキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＥｎｚＣｈｅｋＲ Ｃａｓｐａｓｅ－３ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ）により行った。簡単に、組換え型のカスパーゼ３（１０μＭ）を可溶性のＲａｍｏｓ

溶解物（１ｍｇ／ｍＬ）に加え、１００ｎＭの最終濃度のプロテアーゼを得た。カスパーゼ８（３０μＭ）を可溶性のＲａｍｏｓ溶解物に加え、１μＭの最終濃度のプロテアーゼを得た。三通りで、５０μＬの溶解物を、１時間、ＤＭＳＯ、ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２０μＭ）、又は示された化合物（１００μＭ）で処理し、その後、１０ｍＭのＤＴＴ及び５μＬの基質を含む５０μＬの２倍の反応緩衝液（ＣＡＳＰ８についてはＩＥＴＤ－ＡＦＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５８として開示された「ＩＥＴＤ」）のＤＭＳＯ中の４ｍＭの保存溶液；ＣＡＳＰ３についてはＤＥＶＤ－ＡＭＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）のＤＭＳＯ中の１０ｍＭの保存溶液）を、各ウェルに加えて、サンプルを周囲温度で２時間インキュベートした。カスパーゼ活性を、蛍光の増大（励起３８０ｎｍ、発光４６０ｎｍ）から測定した。実験を３回繰り返して実行した。バックグラウンドを、組換え型のカスパーゼを欠くサンプルから計算した。

【０３７８】

カスパーゼ８阻害剤でのアポトーシスアッセイ

ＲＰＭＩ中の４ｍＬＪｕｒｋａｔ細胞（１５０万個の細胞／ｍＬ）を、３０μＭで３０分間、示された化合物で処理した（ＤＭＳＯ中の５０ｍＭの保存溶液）。Ｚ－ＶＡＤ－ＦＭＫ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，　６２７６１０）を、１００μＭの最終濃度で使用した。プレインキュベーションの後、ＦＡＳＬ（水中のＳｕｐｅｒＦａｓＬｉｇａｎｄ（商標）の１００μｇ／μＬの保存溶液の４μＬ、最終濃度＝１００ｎｇ／ｍＬ、Ｅｎｚｏ　ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）又はスタウロスポリン（ＤＭＳＯ中で１ｍＭの保存溶液の８μＬ、最終濃度＝２μＭ、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，　５０６６４３３３）。６時間後、細胞を遠心分離により収集し、洗浄し、細胞溶解緩衝液（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ，１０６７－１００）の中で溶解して、４０μｇの各サンプルを１４％のポリアクリルアミドゲル上でのＳＤＳ－Ｐａｇｅにより分離した。ゲルをニトロセルロース膜に移し、示された抗体で一晩免疫ブロットした。細胞の生存率の測定のために、各条件について４通りで、１５０，０００の細胞（１５０万の細胞／ｍＬの１００μＬ）を、Ｎｕｎｃ（商標）ＭｉｃｒｏＷｅｌｌ（商標）９６－Ｗｅｌｌ　Ｏｐｔｉｃａｌ－Ｂｏｔｔｏｍ　Ｐｌａｔｅｓ　ｗｉｔｈ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｂａｓｅ（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に蒔いた。化合物としてＦＡＳＬ及びＳＴＳを同じ濃度で使用し、化合物での３０分のプレインキュベーション、その後ＳＴＳ、ＦＡＳＬ、又はＤＭＳＯの何れかで６時間のプレインキュベーションを行った。細胞の生存率を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　（Ｐｒｏｍｅｇａ）で測定し、Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　４のプレートリーダー上で読み出した。

【０３７９】

ウエスタンブロット法

ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ３、及びＰＡＲＰについて、細胞ペレットを、１×ｃＯｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）を含む（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ，１０６７－１００）からの細胞溶解緩衝液の中で再懸濁し、遠心分離（１０分、１６，０００ｇ）前に３０分間、氷の上でインキュベートした。他の全てのタンパク質について、細胞ペレットをＰＢＳ中で再懸濁され、遠心分離（１０分、１６，０００ｇ）前に超音波処理で溶解した。その後、タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分解し、ニトロセルロース膜に移し、ＴＢＳＴ中の５％のＢＳＡで遮断して、示された抗体で探索した。使用される一次抗体及び希釈物は以下のとおりである：抗ｐａｒｐ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　９５３２，１：１０００）、抗ｃａｓｐ３（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　９６６２，　１：５００）、抗ｃａｓｐ８（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　９７４６，　１：５００）、抗ＩＤＨ１（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　１：５００，　３９９７ｓ）、抗アクチン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　３７００，　１：３０００）、抗ｇａｐｄｈ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，　ｓｃ－３２２３３，　１：２０００）、抗ｆｌａｇ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，　Ｆ１８０４，　１：３０００）。ブロットを、振動により４℃で

一晩、一次抗体でインキュベートし、その後、洗浄し（３×５分、ＴＢＳＴ）、周囲温度で１時間、二次抗体（ＬＩＣＯＲ、ＩＲＤｙｅ（登録商標）８００ＣＷ又はＩＲＤｙｅ（登録商標）８００ＬＴ、１：１０，０００）でインキュベートした。ブロットを更に洗浄し（３×５分、ＴＢＳＴ）、ＬＩＣＯＲ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　Ｓｃａｎｎｅｒ上で視覚化した。

【０３８０】

統計分析

データを平均±ＳＥＭとして示す。独立両側スチューデントｔ検定を使用してＰ値を計算した。＜０．０５のＰ値を、有意であると考慮した。

【０３８１】

反応的なドッキングにおける予測の失敗

予想の失敗は、非常に可撓性の／溶解力のある曝露されたループ領域（ＳＴＡＴ１：Ｃ２５５、ＰＤＢ　ＩＤ：１ＹＶＬ；ＨＡＴ１：Ｃ１０１、ＰＤＢ　ＩＤ：２Ｐ０Ｗ；ＺＡＰ７０：Ｃ１１７、ＰＤＢ　ＩＤ：４Ｋ２Ｒ）、又は部分的に埋められた残基（ＳＡＲＳ：Ｃ４３８、ＰＤＢ　ＩＤ：４ｌ８７；ＰＡＩＣＳ：Ｃ３７４、ＰＤＢ　ＩＤ：２Ｈ３１）と共に使用される、剛性モデルの近似によるものであった。幾つかの実施形態において、（可撓性の側鎖など）可撓性のある程度のシミュレーションが、成功率を改善する。幾つかの実施形態において、配列が利用可能なモデル（ＸＰＯ１：Ｃ３４、Ｃ１０７０、ＰＤＢ　ＩＤ：　３ＧＢ８、ＦＮＢＰ１、Ｃ５５５、Ｃ６０９、ＰＤＢ　ＩＤ：Ｃ５１１：２ＥＦＬ；ＩＭＰＤＨ２：Ｃ１４０、ＰＤＢ　ＩＤ：１ＮＦ７）において完全に分解されない時、又はオルソログ配列のみが利用可能（ＰＲＭＴ１：Ｒ．Ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ、ＰＤＢ　ＩＤ：１ＯＲＩ）である時に、方法は結晶構造の利用可能性及び品質により限定されなかった。

【０３８２】

一般的な合成法

化学物質と試薬を、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ａｃｒｏｓ、Ｆｉｓｈｅｒ、Ｆｌｕｋａ、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ＣｏｍｂｉＢｌｏｃｋｓ、ＢｉｏＢｌｏｃｋｓ、及びＭａｔｒｉｘ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃを含む様々な供給業者から購入し、特に定めの無い限り、更に精製することなくこれらを使用した。無水溶媒を、市販で入手可能な予め乾燥させた無酸素の製剤として得た。フラッシュクロマトグラフィーを、２３０－４００のメッシュのシリカゲルを使用し実行した。分取薄層クロマトグラフィー（ＰＴＬＣ）を、５００－２０００μｍの厚みを持つガラスで裏打ちした（ｇｌａｓｓ　ｂａｃｋｅｄ）ＰＴＬＣプレート（Ａｎａｌｔｅｃｈ）を使用して実行した。全ての反応を、０．２５ｍｍのＥ．Ｍｅｒｃｋのシリカゲルプレート（６０Ｆ－２５４）上で実行された薄層クロマトグラフィーによりモニタリングし、ＵＶ光で、又は、ニンヒドリン、エタノール性のリンモリブデン酸、ヨウ素、ｐ－アニスアルデヒド、又は過マンガン酸カリウムの染色により、視覚化した。ＮＭＲスペクトルを、示された溶媒において、Ｖａｒｉａｎ　ＩＮＯＶＡ－４００、Ｂｒｕｋｅｒ　ＤＲＸ－６００、又はＢｒｕｋｅｒ　ＤＲＸ－５００の分光計上で記録した。多様性を以下の略語で報告する：ｓ　一重項；ｄ　二重項；ｔ　三重項；ｑ　四重項；ｐ　五重項（ｐｅｎｔｅｔ）；ｍ　多重項；ｂｒ　広範囲。化学シフトをＴＭＳに対するｐｐｍで報告し、Ｊ値をＨｚで報告した。質量分析のデータを、ＨＰ１１００の単一の四極子の器具（ＥＳＩ；低解像度）又はＡｇｉｌｅｎｔ　ＥＳＩ－ＴＯＦの器具（ＨＲＭＳ）の上に収集した。

【０３８３】

幾つかの実施形態において、基本手順Ａを、本明細書に記載される小分子断片及び／又はシステイン反応性プローブの１つ以上の合成のために使用した。アミンを無水CH_2Cl_2（０．２Ｍ）の中で溶解し、０℃に冷却した。これに、無水ピリジン（１．５当量）を一度に加え、次にクロロアセチルクロリド（１．５当量）を滴下で加え、出発物質の完全消失及び生成物への変換が検出されるまで（典型的に１時間）、反応をＴＬＣによりモニタリングした。反応が完了まで進まなかった場合、ピリジン（０．５当量）およびクロ

ロアセチルクロリド（０．５当量）の追加のアリコートを加えた。反応物をH_2O（１mL）でクエンチし、CH_2Cl_2（２０mL）で希釈し、飽和$NaHCO_3$（１００mL）で２回洗浄した。有機質層を真空内で濃縮し、分取薄層又はフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物を得た。幾つかの実施形態において、基本手順Ａ１は、トリエチルアミン（３当量）がピリジンの代わりに使用されること以外は、基本手順Ａと同様である。幾つかの実施形態において、基本手順Ａ２は、Ｎ－メチルモルホリン（３当量）がピリジンの代わりに使用されること以外は、基本手順Ａと同様である。

【０３８４】

幾つかの実施形態において、基本手順Ｂを、本明細書に記載される小分子断片及び／又はシステイン反応性プローブの１つ以上の合成のために使用した。アミンを無水CH_2Cl_2（０．２M）の中で溶解し、０℃に冷却した。これに、トリエチルアミン（ＴＥＡ、１．５当量）を一度に加え、次にアクリロイルクロリド（１．５当量）を滴下で加え、出発物質の完全消失及び生成物への変換が検出されるまで（典型的に１時間）、反応をＴＬＣによりモニタリングした。反応が完了まで進まなかった場合、ＴＥＡ（０．５当量）及びアクリロイルクロリド（０．５当量）の追加のアリコートを加えた。反応物をH_2O（１mL）でクエンチし、CH_2Cl_2（２０mL）で希釈し、飽和$NaHCO_3$（１００mL）で２回洗浄した。有機質層をシリカのプラグに通して、その後、溶離液を真空内で濃縮し、分取薄層又はフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物を得た。

【０３８５】

幾つかの実施形態において、基本手順Ｃを、本明細書に記載される小分子断片及び／又はシステイン反応性プローブの１つ以上の合成のために使用した。アクリロイルクロリド（８０．４μL、１．０mmol、２当量）を、無水CH_2Cl_2（４mL）に溶解し、０℃に冷却した。その後、CH_2Cl_2（２mL）中のアミン（０．５mmol、１当量）及びＮ－メチルモルホリン（０．１６mL、１．５mmol、３当量）の溶液を、滴下で加えた。反応物を０℃で１時間撹拌し、その後室温にまでゆっくりと暖めた。ＴＬＣ分析により出発物質の消失を示した後、又は６時間後、どちらが早く生じたとしても、反応物を飽和水性$NaHCO_3$（５mL）でクエンチし、CH_2Cl_2（３×１０mL）で抽出した。組み合わせた有機質層を無水Na_2SO_4で乾燥し、真空内で濃縮し、得られた残留物を分取薄層クロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物を得た。

【０３８６】

プローブ及びフラグメントの合成

購入された断片

以下の求電子の断片は示された供給業者から購入された。２（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３４５０８３）、３（Ｋｅｙ Ｏｒｇａｎｉｃｓ ＪＳ－０９２Ｃ）、４（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｔ１４２４３３－１０ｍｇ）、６（Ｔｏｒｏｎｔｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｍ３２０６００）、８（Ａｌｆａ Ａｅｓａｒ Ｈ３３７６３）、１０（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３４５０６０）、１１（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３５４８９５）、１２（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３５４９６６）、２１（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ, ｓｃ－２７９６８１）、２２（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ ６９９３５７－５Ｇ）、２６（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｔ１０９９５９）、２７（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３４２１８４）、２８（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３３５１７３）、２９（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３４８９７８）、３０（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３５５３６２）、３２（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３５４６１３）、３３（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｒ９９６５０５）、３４（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－３５５４７７）、３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｓｃ－

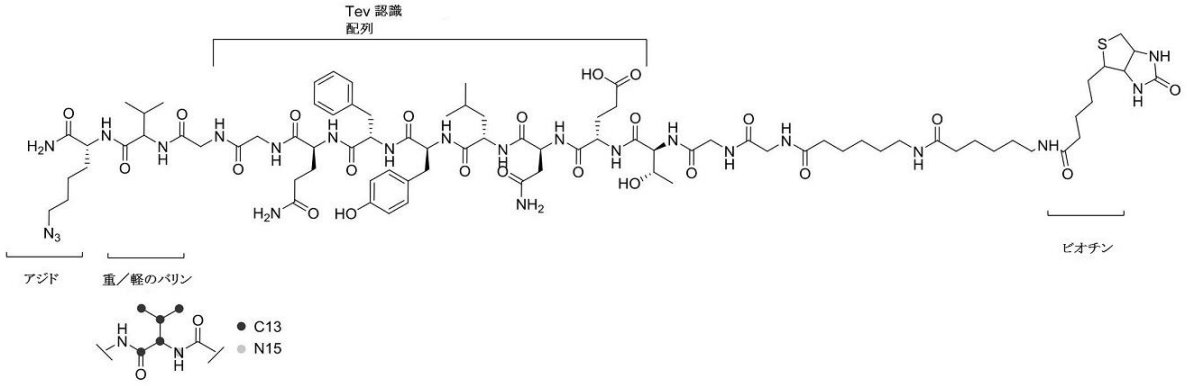
３２８９８５）、４１（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｌ４６９７６９）、４２（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｒ９０１９４６）、４３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｓｃ－３０７６２６）、５２（Ｅｎａｍｉｎｅ，　ＥＮ３００－０８０７５）、５５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｓｃ－３５４８８０）、５７（ＶＷＲ　１００２６８－４４２）、５８（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＡＬＸ－４３０－１４２－Ｍ００５）、６２（ＷｕＸｉ　Ａｐｐｔｅｃ）。

【０３８７】

同位体的に標識されたＴＥＶタグの合成：

【０３８８】

【化６５】



【０３８９】

同位体的に標識された重及び軽タグを、Ｗｅｅｒａｐａｎａ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ　２：１４１４－１４２５　（２００７）及びＷｅｅｒａｐａｎａ　ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔｕｒｅ　４６８：７９０－７９５　（２０１０）にて報告される手順に対して細かな修正を加えて、合成した。Ｆｍｏｃ－Ｒｉｎｋ－アミド－ＭＢＨＡ樹脂（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；０．５Ｍ、８３０ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ／ｇの充填）を、ＤＭＦ（５０％　ｖ／ｖ、２×５ｍＬ、１分）において４－メチルピペリジンで脱保護した。Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（$Ｎ_3$）－ＯＨ（Ａｎａｓｐｅｃ）（５００ｍｇ、１．２６ｍｍｏｌ、１．２６当量）を、ＤＩＥＡ（１１３μｌ）及び２－（６－クロロ－１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスファート（ＨＣＴＵ；ＤＭＦ中の０．５Ｍの保存溶液の１．３ｍＬ）により室温で一晩、樹脂に結合させ、その後、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（$Ｎ_3$）－ＯＨ（５００ｍｇ、１．２６ｍｍｏｌ、１．２６当量）、ＤＩＥＡ（１１３μｌ）、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート（ＨＡＴＵ；ＤＭＦ中の０．５Ｍの保存溶液の１．３ｍＬ）により一晩、２回目の結合を行った。その後、修飾していない樹脂を、ＤＭＦ中で$Ａｃ_2Ｏ$（４００μＬ）及びＤＩＥＡ（７００μＬ）により覆い（２×３０分）、その後、樹脂をＤＭＦ（２×１分）で洗浄した。その後、ＤＭＦ（５０％　ｖ／ｖ、２×５ｍＬ、１分）における４－メチルピペリジンでの脱保護、及びＨＣＴＵ（２ｍＬ、ＤＭＦ中で０．５Ｍ）とＤＩＥＡ（３４７．７μＬ）での結合サイクル（ＤＭＦ中で４当量のＦｍｏｃで保護されたアミノ酸（ＥＭＤ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））を、残りのアミノ酸のために繰り返した。重ＴＥＶタグについて、Ｆｍｏｃ－バリン－ＯＨ（$^{13}Ｃ_5Ｃ_{15}Ｈ_{21}{}^{15}ＮＯ_4$、$^{13}Ｃ_5$、９７－９９％、$^{15}Ｎ$、９７－９９％、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｉｓｏｔｏｐｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ．）を使用した。反応をニンヒドリン染色によりモニタリングし、二重の結合を、完了まで進まなかった全ての工程に使用した。ビオチン（０．２４ｇ、２当量）を、室温で２日間、ＮＨＳ（０．１ｇ、２当量）、ＤＩＣ（０．１６ｇ、２当量）、及びＤＩＥＡ（０．１７５ｇ、２当量）と結合させた。その後、樹脂をＤＭＦ（５ｍＬ、２×１分））で洗浄し、その後、１：１の$ＣＨ_2Ｃｌ_2$：ＭｅＯＨ（５ｍＬ、２×１分）で洗浄し、窒素の流れの下で乾燥させ、丸底フラスコに移した。９５：２．５：２．５の

トリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシランでの処理により、９０分かけてペプチドを樹脂から切断した。樹脂を濾過により取り除き、残りの溶液を冷たいエーテルで粉砕して、白色固形物として軽又は重のＴＥＶタグの何れかを得た。ＨＰＬＣ－ＭＳにより僅かな不純物のみが明らかとなり、化合物を更に精製することなく使用した。ＨＲＭＳ－ＥＳＩ（ｍ／ｚ）：ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{83}H_{128}N_{23}O_{23}S$ ［Ｍ＋Ｈ］：（Ｌｉｇｈｔ－ＴＥＶ－Ｔａｇ）１８４６．９２６８；ｆｏｕｎｄ：１８４６．９１８７；ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{78}{}^{13}C_5H_{128}N_{22}{}^{15}NO_{23}S$ ［Ｍ＋Ｈ］：（Ｈｅａｖｙ－ＴＥＶ－Ｔａｇ）：１８５２．９２３７；ｆｏｕｎｄ：１８５２．９３０９。

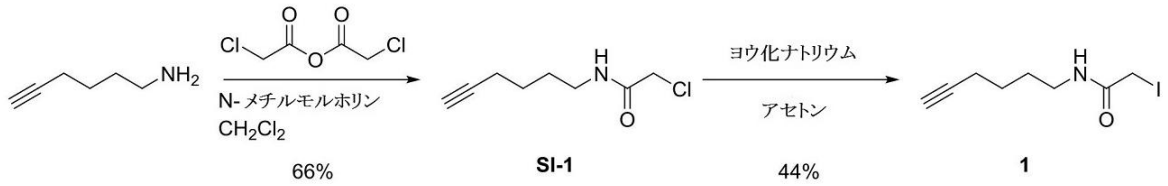
【０３９０】

プローブ及び断片の合成

１の合成

【０３９１】

【化６６】

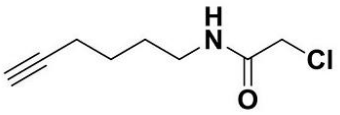


【０３９２】

Ｎ－（ヘキサ－５－イン－１－イル）－２－クロロアセトアミド（ＳＩ－１）

【０３９３】

【化６７】



【０３９４】

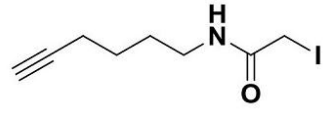
０℃でCH_2Cl_2（３．２ｍＬ、０．２Ｍ）中の５－ヘキシニルアミン（６３ｍｇ、０．６５ｍｍｏｌ、１．０当量）の溶液に、Ｎ－メチルモルホリン（２１５μＬ、３当量）、その後、少量ずつクロロ酢酸無水物（２２２ｍｇ、２当量）を加えた。反応物を室温にし、次いで一晩撹拌した。その後、反応物をエーテル（５０ｍＬ）で希釈し、１ＭのＨＣｌ、１ＭのＮａＯＨ、次いでブライン（各々２０ｍＬ）で洗浄した。組み合わせた有機質層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮して、クロロアセトアミドＳＩ－１（７４ｍｇ、６６％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ）δ ６．７９（ｓ，１Ｈ），４．０９（ｄ，Ｊ＝１．１ Ｈｚ，２Ｈ），３．３４（ｑ，Ｊ＝６．８ Ｈｚ，２Ｈ），２．２３（ｔｄ，Ｊ＝６．９，２．７ Ｈｚ，２Ｈ），１．９８（ｔ，Ｊ＝２．７ Ｈｚ，１Ｈ），１．７５－１．６２（ｍ，４Ｈ），１．６２－１．５１（ｍ，２Ｈ）。

【０３９５】

Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－２－ヨードアセトアミド（１）

【０３９６】

【化６８】



【０３９７】

アセトン（１ｍＬ、０．２Ｍ）中のクロロアセトアミドＳＩ－１（３６．１ｍｇ、０．

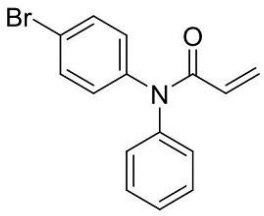
２ｍｍｏｌ）の溶液にヨウ化ナトリウム（４７ｍｇ、１．５当量）を加え、反応物を一晩撹拌した。翌日、反応物を、ヘキサン中で２０％の酢酸エチルで溶出するシリカのプラグに通して濾過し、濾液を濃縮して、所望のヨードアセトアミド１及び出発物質の１０：１の混合物を得た。この混合物を更に１日にわたり反応条件に再びさらし、その時点で完全な変換を観察した。生成物を、ヘキサン中で５～１０％から１５～２０％の酢酸エチルの勾配を利用するシリカゲルクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物（２４ｍｇ、４４％）を得た。幾つか実施形態において、反応物を２．５当量のヨウ化ナトリウムにより実行し、その場合、再度の曝露は必要とされず、ＰＴＬＣによる精製を、溶離剤として３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサンの中で遂行する。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ６．１６ （ｓ，１Ｈ），３．６９ （ｓ，２Ｈ），３．３０ （ｑ，Ｊ ＝ ６．８ Ｈｚ，２Ｈ），２．２３ （ｔｄ，Ｊ ＝ ６．８，２．６ Ｈｚ，２Ｈ），１．９７ （ｔ，Ｊ ＝ ２．６ Ｈｚ，１Ｈ），１．７５－１．６１ （ｍ，２Ｈ），１．６１－１．５２ （ｍ，２Ｈ）。

【０３９８】

Ｎ－（４－ブロモフェニル）－Ｎ－フェニルアクリルアミド（５）

【０３９９】

【化６９】



【０４００】

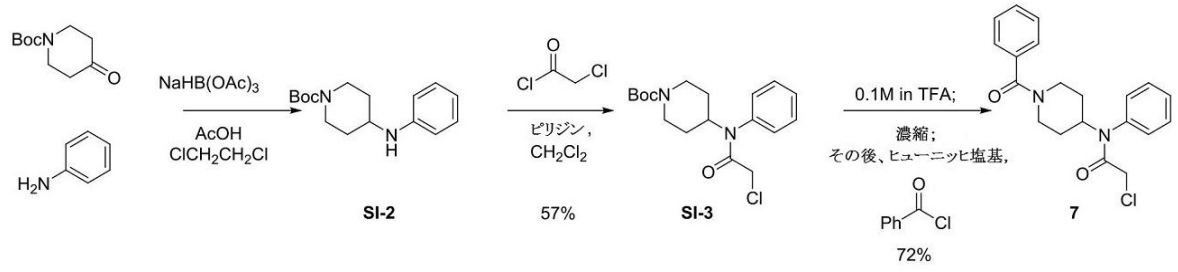
４－ブロモフェニルアニリン（１８．９ｍｇ、０．０７６２ｍｍｏｌ、１当量）から、表題化合物を基本手順Ｃに従い合成した。分取ＴＬＣ（３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）による粗製生成物の精製によって、白色固形物（１２．５ｍｇ、５４％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ７．４７ （ｄ，Ｊ ＝ ８．２ Ｈｚ，２Ｈ），７．３９ （ｔ，Ｊ ＝ ７．６ Ｈｚ，２Ｈ），７．３２ （ｄ，Ｊ ＝ ７．４ Ｈｚ，１Ｈ），７．２１ （ｄ，Ｊ ＝ ７．７ Ｈｚ，２Ｈ），７．１２ （ｄ，Ｊ ＝ ８．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．４８ （ｄ，Ｊ ＝ １６．７ Ｈｚ，１Ｈ），６．１７ （ｄｄ，Ｊ ＝ １６．８，１０．３ Ｈｚ，１Ｈ），５．６５ （ｄ，Ｊ ＝ １０．３ Ｈｚ，１Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{15}H_{13}BrNO$ ［Ｍ＋Ｈ］：３０２．０１７５；ｆｏｕｎｄ：３０２．０１７６。

【０４０１】

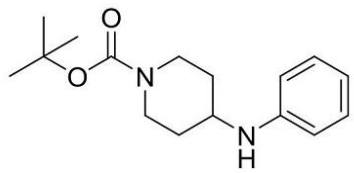
７の合成

【０４０２】

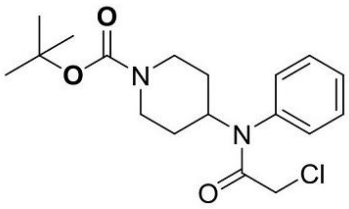
【化７０】



ｔｅｒｔ－ブチル４－（フェニルアミノ）ピペリジン－１－カルボン酸塩（ＳＩ－２）
【０４０３】
【化７１】

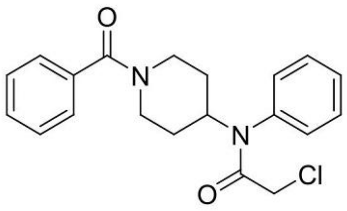


【０４０４】
Ｔｈｏｍａ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４７：１９３９－１９５５（２００４）に従い、ＳＩ－２を調製した。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ）δ ７．２４－７．１２（ｍ，２Ｈ），６．７５－６．６８（ｍ，１Ｈ），６．６６－６．５８（ｍ，２Ｈ），３．８８－３．８１（ｍ，１Ｈ），３．４４（ｔｔ，Ｊ＝１０．４，３．９ Ｈｚ，２Ｈ），３．００－２．８８（ｍ，２Ｈ），２．１０－１．９９（ｍ，２Ｈ），１．４８（ｂｓ ９Ｈ），１．４１－１．２７（ｍ，２Ｈ）。
【０４０５】
ｔｅｒｔ－ブチル４－（２－クロロ－Ｎ－フェニルアセトアミド）ピペリジン－１－カルボン酸塩（ＳＩ－３）
【０４０６】
【化７２】



【０４０７】
CH_2Cl_2（０．６ｍＬ）中の０℃でのアニリンＳＩ－２（６５ｍｇ、０．２４ｍｍｏｌ）の溶液に、ピリジン（３８μＬ、２当量）、その後、CH_2Cl_2（０．６ｍＬ）中のクロロアセチルクロリド（３７．４μＬ、２．０当量）を加えた。結果として生じる溶液を室温に暖め、一晩撹拌した。その後、溶液を、飽和水性重炭酸ナトリウムでクエンチし、Et_2O（３×１０ｍＬ）で抽出した。組み合わせた有機質層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、オフホワイトの固形物を得て、それを更に生成することなく使用した（４７ｍｇ、５７％）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ）δ ７．４７－７．３８（ｍ，３Ｈ），７．１８－７．０３（ｍ，２Ｈ），４．７５－４．６３（ｍ，１Ｈ），４．０７（ｓ，２Ｈ），３．６８（ｓ，２Ｈ），２．７６（ｓ，２Ｈ），１．８４－１．６９（ｍ，２Ｈ），１．３５（ｓ，９Ｈ），１．２７－１．１２（ｍ，２Ｈ）。
【０４０８】
Ｎ－（１－ベンゾイルピペリジン－４－イル）－２－クロロ－Ｎ－フェニルアセトアミド（７）
【０４０９】

【化７３】



【０４１０】

きれいな（ｎｅａｔ）ＳＩ－３（４７ｍｇ、０．１２８ｍｍｏｌ）に、トリフルオロ酢酸（０．７ｍＬ、最終０．２Ｍ）を加えた。これ以上蒸発が観察されなくなるまで結果として生じる溶液を窒素の流れの下で濃縮し、そのトリフルオロ酢酸塩として脱保護されたアミンを得た。その後、この粘着性ガムを、酢酸エチル中のトリエチルアミン（１０％ｖ／ｖ、２ｍＬ；追加後に溶液は煙を出す）で処理した。結果として生じる溶液を濃縮し、遊離塩基を得て、これは、プロトンＮＭＲによりトリエチルアンモニウムトリフルオロアセテート及び遊離アミンしか含んでいなかった。保存溶液を、CH_2Cl_2（１．２ｍＬ、～０．１Ｍの最終）の中で結果として生じるガムを溶解することにより調製した。

【０４１１】

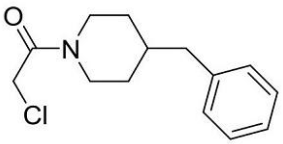
脱保護したアミン（０．３ｍＬの保存溶液、０．０３１９ｍｍｏｌ）を、ヒューニッヒ塩基（１７．５μＬ、３当量）及び塩化ベンゾイル（７．６μＬ、２．０当量）で処理した。この溶液を一晩撹拌し、飽和水性重炭酸ナトリウムでクエンチし、Et_2O（３×１０ｍＬ）で抽出した。結果として生じる溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮した。結果として生じる油をシリカゲルクロマトグラフィー（２０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）により精製し、白色固形物（８．６ｍｇ、７５％）としてクロロアセトアミド７を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．５５ （ｄｄ， Ｊ ＝ ５．５， ３．０ Ｈｚ， ３Ｈ）， ７．５０－７．３２ （ｍ， ５Ｈ）， ７．２１ （ｓ， ２Ｈ）， ４．９２ （ｔｔ， Ｊ ＝ １２．３， ４．０ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．８７ （ｓ， １Ｈ）， ３．８７ （ｓ， １Ｈ）， ３．７８ （ｓ， ２Ｈ）， ３．２１ （ｓ， １Ｈ），２．９７－２．９０ （ｍ， １Ｈ）， ２．０１ （ｓ， １Ｈ）， １．９０ （ｓ， １Ｈ）， １．４５ （ｓ， １Ｈ）， １．３６－１．２６ （ｍ， １Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{20}H_{22}ClN_2O_2$ ［Ｍ＋Ｈ］：３５７．１３６４；ｆｏｕｎｄ：３５７．１３６２。

【０４１２】

１－（４－ベンジルピペリジン－１－イル）－２－クロロエタン－１－オン（９）

【０４１３】

【化７４】



【０４１４】

基本手順Ａに従い、４－ベンジルピペリジン（８４０ｍｇ、５．２ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、所望の化合物を黄色の油（１ｇ、８１％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。分光分析データは、Ｐａｐａｄｏｐｏｕｌｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５５：５５５４－５５６５（２０１２）において以前に報告されたものと一致する。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．４２－７．１４ （ｍ， ５Ｈ）， ４．６１ （ｄ， Ｊ ＝ １３．４ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．１４ （ｑ， Ｊ ＝ ２１．９， １１．５ Ｈｚ， ２Ｈ）， ３．８９ （ｄ， Ｊ ＝ １３．５， １Ｈ）， ３．１１ （ｔｄ， Ｊ ＝ １３．１，

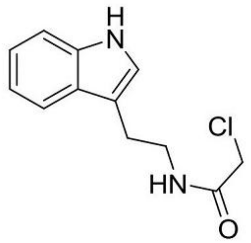
２．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　２．６９－２．５７　（ｍ，　３Ｈ），　１．９２－１．７５　（ｍ，　３Ｈ），　１．４０－１．２１　（ｍ，　２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{14}H_{19}ClNO$　［Ｍ＋Ｈ］：２５２．１１５；ｆｏｕｎｄ：２５２．１１５。

【０４１５】

Ｎ－（２－（１Ｈ－インドール－３－イル）エチル）－２－クロロアセトアミド（１３）

【０４１６】

【化７５】



【０４１７】

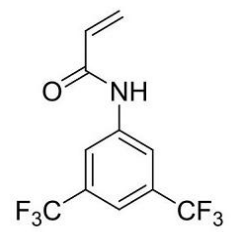
基本手順Ａに従い、トリプトアミン（４００ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、所望の化合物を茶色がかった固形物（４６０ｍｇ、７７％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（５００　ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）　δ　８．５５　（ｓ，　１Ｈ），　７．７０　（ｄ，　Ｊ　＝　７．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．４５　（ｄ，　Ｊ　＝　８．１　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．３０　（ｔ，　Ｊ　＝　７．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．２３　（ｔ，　Ｊ　＝　７．４　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．１０　（ｓ，　１Ｈ），　６．８４　（ｓ，　１Ｈ），　４．０８　（ｓ，　２Ｈ），　３．７２　（ｑ，　Ｊ　＝　６．４　Ｈｚ，　２Ｈ），　３．１０　（ｔ，　Ｊ　＝　６．８　Ｈｚ，　２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{12}H_{14}ClN_2O_2$　［Ｍ＋Ｈ］：２３７．０７８９；ｆｏｕｎｄ：２３７．０７９１。

【０４１８】

Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）アクリルアミド（１４）

【０４１９】

【化７６】



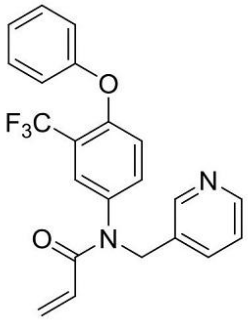
【０４２０】

基本手順Ｂに従い、３，５－ビス（トリフルオロメチル）アニリン（１．１６ｇ、５ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、所望の化合物を白色固形物（１．０５ｇ、７４％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（５００　ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）　δ　８．３３　（ｓ，　１Ｈ），　８．１８　（ｓ，　２Ｈ），　７．６８　（ｓ，　１Ｈ），　６．５７　（ｄ，　Ｊ　＝　１７．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　６．３８　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１６．９，　１０．３　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．９３　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．５　Ｈｚ，　１Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{11}H_8F_6NO_2$　［Ｍ＋Ｈ］：２８４．０５０５；ｆｏｕｎｄ：２８４．０５０４。

【０４２１】

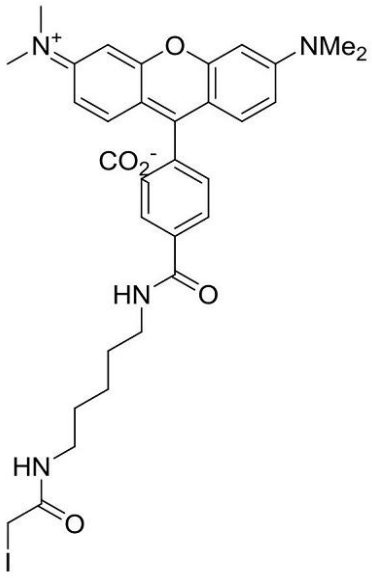
Ｎ－（４－フェノキシ－３－（トリフルオロメチル）フェニル）－Ｎ－（ピリジン－３－

イルメチル）アクリルアミド（１５）
【０４２２】
【化７７】



【０４２３】
４－フェノキシ－３－（トリフルオロメチル）アニリン（２６０ｍｇ、１ｍｍｏｌ、１当量）（Ｃｏｍｂｉ－Ｂｌｏｃｋｓ）をＴＦＡ（５ｍＬ）中に溶解した。Ｂｏｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．　Ｊ．　Ｏｒｇ．　Ｃｈｅｍ　７４：３５８７－３５９０　（２００９）により報告されたＢｏｒｏｓらにより報告された還元的アミノ化のプロトコルに従い、反応混合物を０℃に冷却し、これにナトリウムトリアセトキシボロヒドリド（ＳＴＡＢ）（２７０ｍｇ、１．３ｍｍｏｌ、１．３当量）を加えた。３－ピリジンカルボキサルデヒド（２００ｍｇ、２ｍｍｏｌ、２当量）をCH_2Cl_2（５ｍＬ）中で溶解し、反応混合物へとゆっくり加えた。生成物への完全な変換後、反応物をCH_2Cl_2（２０ｍＬ）で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム溶液（３×２０ｍＬ）で洗浄し、次いで有機質層を乾燥し、減圧下で濃縮した。更なる精製を必要とせず、粗製物を無水CH_2Cl_2中で溶解し、基本手順Ｂにさらした。結果として生じる粗製物を、分取ＴＬＣにより精製して、白色固形物（３１ｍｇ、１０％）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（５００　ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）δ　８．５２　（ｄ，　Ｊ　＝　３．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　８．３９　（ｓ，　１Ｈ），　７．６８　（ｄ，　Ｊ　＝　７．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．４０　（ｔ，　Ｊ　＝　７．７　Ｈｚ，　２Ｈ），　７．３４　（ｓ，　１Ｈ），　７．２８－７．１８　（ｍ，　２Ｈ），　７．０７　（ｄ，　Ｊ　＝　８．２　Ｈｚ，　２Ｈ），６．９８　（ｄ，　Ｊ　＝　７．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　６．８２　（ｄ，　Ｊ　＝　８．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　６．４６　（ｄ，　Ｊ　＝　１６．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　６．０１　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１６．２，　１０．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．６４　（ｄ，　Ｊ　＝　１０．３　Ｈｚ，　１Ｈ），　４．９６　（ｓ，　２Ｈ）。ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{22}H_{18}F_3N_2O_2$　［Ｍ＋Ｈ］：３９９．１３１５；ｆｏｕｎｄ：３９９．１３１５。
【０４２４】
ヨードアセトアミド－ローダミン（１６）
【０４２５】

【化７８】



【０４２６】

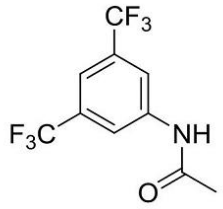
５－（及び－６）－（（Ｎ－（５－アミノペンチル）アミノ）カルボニル）テトラメチルローダミン（テトラメチルローダミンカダベリン）を混合した異性体（６０ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ、１当量）を、超音波処理により無水ＤＭＦ（５００μＬ）中で溶解した。これにＤＩＰＥＡ（６０μＬ、０．３４ｍｍｏｌ、３当量）及びクロロアセチルクロリド（１０μＬ、０．１３ｍｍｏｌ、１当量、ＤＭＦ中で１：１０に希釈）を加え、生成物への完全な変換をＴＬＣにより検出するまで、反応物を室温で２０分間撹拌した。ＤＭＦを窒素の流れの下で取り除き、反応混合物をＭｅＯＨ：CH_2Cl_2：ＴＥＡ（１５：８５：０．００１）におけるＰＴＬＣにより分離した。その後、クロロアセトアミドローダミンをＭｅＯＨ：CH_2Cl_2（１５：８５）の中で溶出し、減圧下で濃縮し、アセトン（５００μＬ）の中で再溶解した。これにＮａＩ（１５０ｍｇ、１ｍｍｏｌ、１０当量）を加え、生成物への完全な変換を検出するまで反応物を５０℃で２０分間撹拌し、粗製の反応混合物をＣ１８カラム上での逆相ＨＰＬＣにより精製し、濃縮して、５及び６のカルボキサミドテトラメチルローダミン異性体（比率～６：１）（１０ｍｇ、１２％）の混合物である紫色の固形物として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （６００ ＭＨｚ，メタノール－d_4） δ ８．８７ （ｔ，Ｊ ＝ ４．８ Ｈｚ， ０．１４ Ｈ），８．８０－８．７１ （ｍ， １Ｈ），８．４１ （ｄｄ，Ｊ ＝ ８．２，１．１ Ｈｚ， ０．８６Ｈ），８．３５ （ｂｒ ｓ， １Ｈ），８．２７ （ｄｔ，Ｊ ＝ ７．９，１．５ Ｈｚ， ０．１６４ Ｈ），８．２０ （ｄｔ，Ｊ ＝ ８．２，１．５ Ｈｚ， ０．８６Ｈ），７．８１ （ｓ， ０．８６Ｈ），７．５３ （ｄ，Ｊ ＝ ７．８ Ｈｚ， ０．１４ Ｈ），７．１８－７．１１ （ｍ， ２Ｈ），７．０７ （ｄ，Ｊ ＝ ９．５ Ｈｚ，２Ｈ），７．００ （ｓ， ２Ｈ），３．６８－３．６２ （ｍ， ２Ｈ），３．４６－３．３７ （ｍ，２Ｈ），３．３１ （ｓ， １２Ｈ，溶媒により不明瞭にされる） ３．２１－３．１２ （ｍ， ２Ｈ），１．８１－１．２１ （ｍ， ６Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ（ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{32}H_{36}IN_4O_5$ ［Ｍ＋Ｈ］：６８３．１７２５；ｆｏｕｎｄ：６８３．１７１６。

【０４２７】

Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）アセトアミド（１７）

【０４２８】

【化７９】



【０４２９】

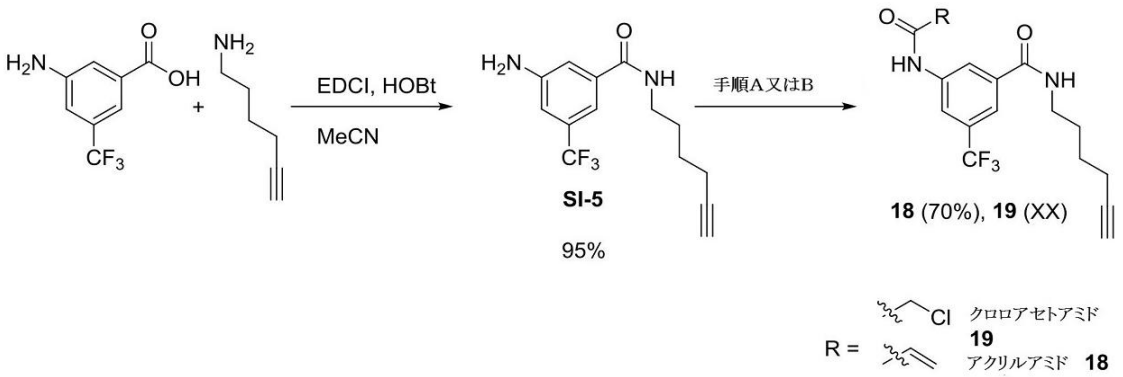
基本手順Ａに従い、３，５－ビス（トリフルオロメチル）アニリン（３２７ｍｇ、１．４２ｍｍｏｌ、１当量）及び無水酢酸（２００μＬ、３ｍｍｏｌ、２当量）から出発して、表題化合物を白色固形物（３０２ｍｇ、７８％）としてＰＴＬＣの後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．１０ （ｓ， ２Ｈ）， ７．７２ （ｓ， １Ｈ）， ７．６８ （ｓ， １Ｈ）， ２．３２ （ｄ， Ｊ ＝ ０．９ Ｈｚ， ３Ｈ）。ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{11}H_8F_6NO_2$ ［Ｍ＋Ｈ］：２８４．０５０５；ｆｏｕｎｄ：２８４．０５０４。

【０４３０】

１８及び１９の合成

【０４３１】

【化８０】

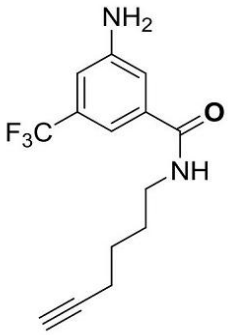


【０４３２】

３－アミノ－Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－（トリフルオロメチル）ベンズアミド（ＳＩ－５）

【０４３３】

【化８１】



【０４３４】

アセトニトリル（３．６ｍＬ、０．１Ｍの最終）中の３－アミノ－５－（トリフルオロメチル）安息香酸（７４ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ）の溶液に、ＥＤＣＩ（８３ｍｇ、１．２当量）、その後１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢｔ、６６．３ｍｇ、１．２当量）を加え、結果として生じる溶液を一晩撹拌した。反応物を酢酸エチルで希釈

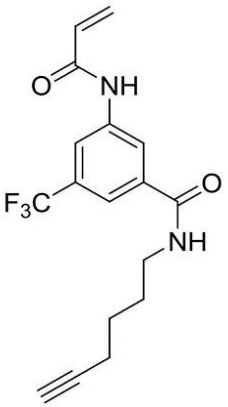
し、１MのＨＣｌで２回、次いでブラインで洗浄した。有機質層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮して、白色固形物としてアニリンＳＩ－５（９７．４ｍｇ、９５％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．２９－７．２２ （ｍ， ２Ｈ）， ６．９８ （ｔ， Ｊ ＝ １．８ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．３８ （ｔ， Ｊ ＝ ５．５ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．０８ （ｓ， ２Ｈ）， ３．４６ （ｔｄ， Ｊ ＝ ７．１， ５．７ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．２５ （ｔｄ， Ｊ ＝ ６．９， ２．６ Ｈｚ， ２Ｈ）， １．９９ （ｔ， Ｊ ＝ ２．７ Ｈｚ， １Ｈ）， １．８１－１．５５ （ｍ， ４Ｈ）。

【０４３５】

３－アクリルアミド－Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－（トリフルオロメチル）ベンズアミド（１８）

【０４３６】

【化８２】



【０４３７】

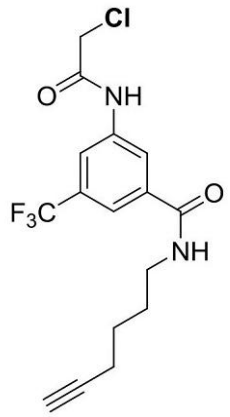
基本手順Ｂに従い、ＳＩ－５（４２ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ、１当量）で出発して、表題化合物を白色固形物（３４ｍｇ、７０％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．９４ （ｓ， １Ｈ）， ８．２４ （ｄ， Ｊ ＝ １１．９ Ｈｚ， ２Ｈ）， ７．７１ （ｓ， １Ｈ）， ６．８７ （ｔ， Ｊ ＝ ５．７ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．５５ （ｄｄ， Ｊ ＝ １７．４， ０．７ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．４３ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．９， １０．１ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．８８ （ｄｄ， Ｊ ＝ １０．１， １．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．５６ （ｑ， Ｊ ＝ ６．７ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．３３ （ｔｄ， Ｊ ＝ ６．９， ２．７ Ｈｚ， ２Ｈ）， ２．０６ （ｔ， Ｊ ＝ ２．７ Ｈｚ， １Ｈ）， １．８７ （ｐ， Ｊ ＝ ７．３ Ｈｚ， ２Ｈ）， １．６９ （ｐ， Ｊ ＝ ７．８ Ｈｚ， ２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{17}H_{18}F_3N_2O_2$ ［Ｍ＋Ｈ］：３３９．１３１４；ｆｏｕｎｄ ３３９．１３１３。

【０４３８】

３－アクリルアミド－Ｎ－（ｈｅｘ－５－イン－１－イル）－（トリフルオロメチル）ベンズアミド（１９）

【０４３９】

【化８３】



【０４４０】

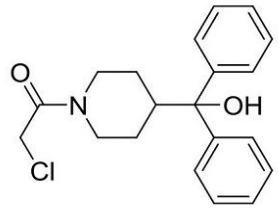
ＳＩ－５から出発して、基本手順Ａ２に従い合成した。^{1}Ｈ ＮＭＲ （６００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ８．５７ （ｓ，１Ｈ），８．１６ （ｔ，Ｊ ＝ １．８ Ｈｚ，１Ｈ），８．０５ （ｔ，Ｊ ＝ １．８ Ｈｚ，１Ｈ），７．７９ （ｄ，Ｊ ＝ ２．０ Ｈｚ，１Ｈ），６．３８ （ｄ，Ｊ ＝ ６．１ Ｈｚ，１Ｈ），４．２３ （ｓ，２Ｈ），３．５１ （ｔｄ，Ｊ ＝ ７．１，５．７ Ｈｚ，２Ｈ），２．２７ （ｔｄ，Ｊ ＝ ６．９，２．７ Ｈｚ，２Ｈ），２．００ （ｔ，Ｊ ＝ ２．６ Ｈｚ，１Ｈ），１．８２－１．７４ （ｍ，２Ｈ），１．７１－１．５９ （ｍ，２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{16}H_{17}ClF_3N_2O_2$ ［Ｍ＋Ｈ］：３６１．０９２５；ｆｏｕｎｄ：３６１．０９２５。

【０４４１】

２－クロロ－１－（４－（ヒドロキシジフェニルメチル）ピペリジン－１－イル）エタン－１－オン（２０）

【０４４２】

【化８４】



【０４４３】

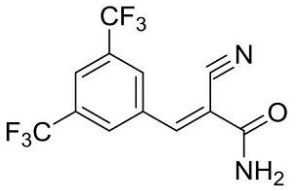
基本手順Ａに従い、α，α－ジフェニル－４－ピペリジノメタノール（８００ｍｇ、３ｍｍｏｌ、１当量）で出発して、表題化合物を白色固形物（６３７ｍｇ、６１％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ７．５６ （ｄ，Ｊ ＝ ７．６ Ｈｚ，４Ｈ），７．３９ （ｑ，Ｊ ＝ ７．１ Ｈｚ，４Ｈ），７．２８ （ｑ，Ｊ ＝ ６．８ Ｈｚ，２Ｈ），４．６６ （ｄ，Ｊ ＝ １３．３ Ｈｚ，１Ｈ），４．０７ （ｄｄ，Ｊ ＝ １２．２，４．２ Ｈｚ，２Ｈ），３．９１ （ｄ，Ｊ ＝ １３．４ Ｈｚ，１Ｈ），３．１８ （ｔ，Ｊ ＝ １２．９ Ｈｚ，１Ｈ），２．７７－２．６２ （ｍ，３Ｈ），１．６７ （ｔ，Ｊ ＝ １２．５ Ｈｚ，２Ｈ），１．５６ （ｑ，Ｊ ＝ １１．８ Ｈｚ，１Ｈ），１．４４ （ｑ，Ｊ ＝ １２．４，１１．８ Ｈｚ，１Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{20}H_{23}ClNO_2$ ［Ｍ＋Ｈ］：３４４．１４１２；ｆｏｕｎｄ：３４４．１４１２。

【０４４４】

（Ｅ）－３－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－２－シアノアクリルアミド（２３）

【０４４５】

【化８５】



【０４４６】

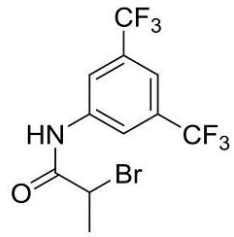
３，５－ビス（トリフルオロメチル）ベンズアルデヒド（８８０ｍｇ、３．６ｍｍｏｌ、１当量）及び２－シアノアセトアミド（４６０ｍｇ、５．５ｍｍｏｌ、１．５当量）をＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中で溶解した。これにピペリジン（２１４ｍｇ、０．７当量）を加え、反応物を室温で３０分間撹拌し、その時点で出発物質を消耗させた。当量の水（１０ｍＬ）の追加後、沈澱物を濾過により集め、水／メタノール（１：１）で洗浄し、白色固形物（５３４ｍｇ、４７％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００　ＭＨｚ，　アセトン－ｄ$_{6}$）　δ　８．７８　（ｓ，　２Ｈ），　８．６１　（ｓ，　１Ｈ），　８．４１　（ｓ，　１Ｈ），　７．５７　（ｓ，　１Ｈ），　７．４２　（ｓ，　１Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　Ｃ$_{12}$Ｈ$_{7}$Ｆ$_{6}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{2}$　［Ｍ＋Ｈ］：３０９．０４５７；ｆｏｕｎｄ：３０９．０４５９。

【０４４７】

Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－２－ブロモプロパンアミド（２４）

【０４４８】

【化８６】



【０４４９】

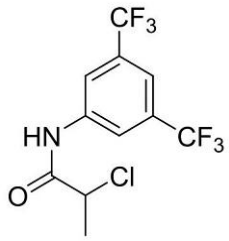
基本手順Ａ１に従い、３，５－ビス（トリフルオロメチル）アニリン（２５０ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ、１当量）及び２－ブロモプロピオニルクロリド（２００μＬ、２ｍｍｏｌ、１．８当量）から出発して、表題化合物を白色固形物（１３０ｍｇ、３５％）としてＰＴＬＣの後に得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（５００　ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）　δ　８．３４　（ｓ，　１Ｈ），　８．０６　（ｓ，　２Ｈ），　７．６６　（ｓ，　１Ｈ），　４．５８　（ｑ，　Ｊ　＝　７．０　Ｈｚ，　１Ｈ），　１．９８　（ｄ，　Ｊ　＝　７．０　Ｈｚ，　３Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　Ｃ$_{11}$Ｈ$_{7}$ＢｒＦ$_{6}$ＮＯ　［Ｍ－Ｈ］：３６１．９６２１；ｆｏｕｎｄ：３６１．９６２３。

【０４５０】

Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－２－クロロプロパンアミド（２５）

【０４５１】

【化８７】



【０４５２】

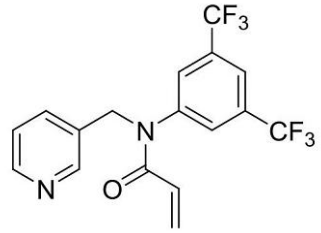
基本手順Ａ１に従い、３，５－ビス（トリフルオロメチル）アニリン（３２７ｍｇ、１．４２ｍｍｏｌ、１当量）及び２－クロロプロピオニルクロリド（２００μＬ、２ｍｍｏｌ、１．８当量）から出発して、表題化合物を白色固形物（２５０ｍｇ、５５％）としてＰＴＬＣの後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．６１ （ｓ， １Ｈ）， ８．１６ （ｓ， ２Ｈ）， ７．７５ （ｓ， １Ｈ）， ４．６７ （ｑ， Ｊ ＝ ７．１ Ｈｚ， １Ｈ）， １．９３ （ｄ， Ｊ ＝ ７．１ Ｈｚ， ３Ｈ）。ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{11}H_7ClF_6NO$ ［Ｍ－Ｈ］：３１８．０１２６；ｆｏｕｎｄ：３１８．０１２６。

【０４５３】

Ｎ－（３，５－ビス（トリフルオロメチル）フェニル）－Ｎ－（ピリジン－３－イルメチル）アクリルアミド（３１）

【０４５４】

【化８８】

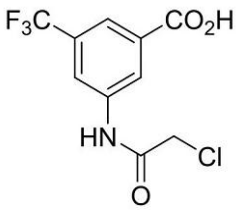


【０４５５】

３，５－ビス（トリフルオロメチル）アニリン（３５０ｍｇ、１．６ｍｍｏｌ、１当量）をＴＦＡ（５ｍＬ）中で溶解した。反応混合物を０℃に冷却し、これにナトリウムトリアセトキシボロヒドリド（ＳＴＡＢ）（４００ｍｇ、２ｍｍｏｌ、１．３当量）を加えた。３－ピリジンカルボキサルデヒド（２４４ｍｇ、２ｍｍｏｌ、１当量）をCH_2Cl_2（５ｍＬ）中で溶解し、１０分にわたり滴下で反応混合物へとゆっくり加えた。生成物への完全な変換後、反応混合物をCH_2Cl_2（２０ｍＬ）で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム溶液（３×２０ｍＬ）で洗浄し、次いで有機質層を乾燥し、減圧下で濃縮した。更なる精製を必要とせず、粗製物を無水CH_2Cl_2中で溶解し、基本手順Ｂにさらした。結果として生じる粗製物をＰＴＬＣにより精製して、白色固形物（１０ｍｇ、２％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．６３ （ｄ， Ｊ ＝ ３．８ Ｈｚ， １Ｈ）， ８．４９ （ｓ， １Ｈ）， ７．９３ （ｓ， １Ｈ）， ７．７０ （ｄ， Ｊ ＝ ７．７ Ｈｚ， １Ｈ）， ７．５５ （ｓ， ２Ｈ）， ７．３５ （ｄｄ， Ｊ ＝ ７．６， ５．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．６０ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．６， １．６ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．０２ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．９， １０．２ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．７９ （ｄｄ， Ｊ ＝ １０．３， １．６ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．１１ （ｓ， ２Ｈ）。ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{17}H_{13}F_6N_2O$ ［Ｍ＋Ｈ］：３７５．０９２７；ｆｏｕｎｄ：３７５．０９２８。

【０４５６】

３－（２－クロロアセトアミド）－５－（トリフルオロメチル）安息香酸（３６）
【０４５７】
【化８９】

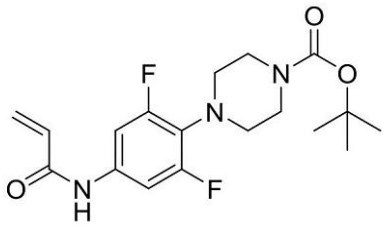


【０４５８】
０℃で１．５ｍＬのジメチルアセトアミド（１．６Ｍ）中のる３－アミノ－５－（トリフルオロメチル）安息香酸（５００ｍｇ、２．４４ｍｍｏｌ）の溶液に、クロロアセチルクロリド（２１４μＬ、２．６９ｍｍｏｌ、１．１当量）を加えた。結果として生じる溶液を周囲温度に暖め、２０分間撹拌し、その時点で酢酸エチル（４０ｍＬ）及び水（３０ｍＬ）を加えた。水層のｐＨを、１ＮのＮａＯＨの追加によりｐＨ１０に調整し、相を分離した。水層を４０ｍＬの酢酸エチルで洗浄し、次いで１ＮのＨＣｌを加えることにより酸性化した。生成物を酢酸エチル（４０ｍＬ）で抽出し、有機質層を１ＭのＨＣｌ（２×４０ｍＬ）、ブライン（４０ｍＬ）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮して所望の生成物（４５６ｍｇ、６６％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．３１ （ｓ， １Ｈ）， ８．２７ （ｓ， １Ｈ）， ８．１４ （ｓ， １Ｈ）， ４．１３ （ｓ， ２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{10}H_8ClF_3NO_3$ ［Ｍ＋Ｈ］：２８２．０１３９；ｆｏｕｎｄ：２８２．０１４１。
【０４５９】
１－（４－（５－フルオロベンズイソキサゾール－３－イル）ピペリジン－１－イル）ｐｒｏｐ－２－エン－１－オン（３７）
【０４６０】
【化９０】

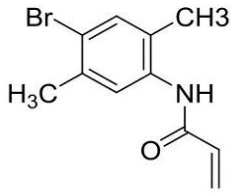


【０４６１】
基本手順Ｃに従い、６－フルオロ－３（４－ピペリジニル）－１，２－ベンズイソキサゾール塩酸塩（５３ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、表題化合物を無色の油（４９．１ｍｇ、８７％）として得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．６４ （ｄｄ， Ｊ ＝ ８．７， ５．１ Ｈｚ， １Ｈ）， ７．２７ （ｄｄ， Ｊ ＝ ８．４， ２．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ７．０８ （ｔｄ， Ｊ ＝ ８．９， ２．１ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．６４ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．８， １０．６ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．３２ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．９， １．９ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．７３ （ｄｄ，Ｊ ＝ １０．６， １．９ Ｈｚ， １Ｈ），４．７０ （ｄ， Ｊ ＝ １３．４ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．１５ （ｄ， Ｊ ＝ １２．４ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．５３－３．１３ （ｍ， ２Ｈ）， ２．９９ （ｔ， Ｊ ＝ １３．１ Ｈｚ， １Ｈ）， ２．２５－２．０７ （ｍ， ２Ｈ），２．００ （ｄｄｄ， Ｊ ＝ ２３．１， １４．２， ７．８ Ｈｚ， ２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{15}H_{16}FN_2O$ ［Ｍ＋Ｈ］：２７５．１１９；ｆｏｕｎｄ：２７５．１１９。
【０４６２】
ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アクリルアミド－２，６－ジフルオロフェニル）ピペラジン

－１－カルボン酸塩（３８）
【０４６３】
【化９１】

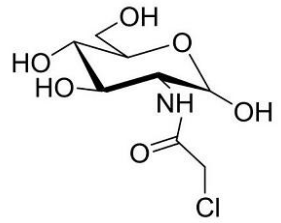


【０４６４】
基本手順Ｂに従い、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アミノ－２，６－ジフルオロフェニル）ピペラジン－１－カルボン酸塩から出発して、表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ８．１２ （ｓ， １Ｈ）， ７．１３ （ｄ， Ｊ ＝ １０．４ Ｈｚ， ２Ｈ）， ６．３６ （ｄ， Ｊ ＝ １６．９ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．１９ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．８， １０．２ Ｈｚ， １Ｈ），５．７０ （ｄ， Ｊ ＝ １０．２ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．４５ （ｔ， Ｊ ＝ ４．７ Ｈｚ， ４Ｈ）， ３．００ （ｔ， Ｊ ＝ ３．７ Ｈｚ， ４Ｈ）， １．４１ （ｓ， ９Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{18}H_{24}F_2N_3O_3$ ［Ｍ＋Ｈ］：３６８．１７８；ｆｏｕｎｄ：３６８．１７８。
【０４６５】
Ｎ－（４－ブロモ－２，５－ジメチルフェニル）アクリルアミド（４０）
【０４６６】
【化９２】



【０４６７】
基本手順Ｂに従い、４－ブロモ－２，５－ジメチルアニリン（９００ｍｇ、４．５ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、表題化合物を白色固形物（６１１ｍｇ、４０％）として、カラムクロマトグラフィー及び冷たいCH_2Cl_2からの再結晶化の後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．８７ （ｓ， １Ｈ）， ７．４３ （ｓ， １Ｈ）， ７．１６ （ｓ， １Ｈ）， ６．５０ （ｄ， Ｊ ＝ １６．７ Ｈｚ， １Ｈ）， ６．３５ （ｄｄ， Ｊ ＝ １６．４， １０．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．８６ （ｄ， Ｊ ＝ １０．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ２．４２ （ｓ， ３Ｈ）， ２．２８ （ｓ， ３Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{11}H_{13}BrNO$ ［Ｍ＋Ｈ］：２５４．０１７５；ｆｏｕｎｄ：２５４．０１７５。
【０４６８】
２－クロロアセトアミド－２－デオキシ－α／β－Ｄ－グルコピラノース（４４）
【０４６９】

【化９３】



【０４７０】

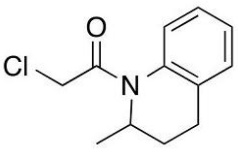
室温で無水ＭｅＯＨ（２００ｍＬ）中のヘキソサミン塩酸塩（５９０ｍｇ、３．３９ｍｍｏｌ、１当量）の撹拌溶液に、ナトリウム金属（６０ｍｇ、２．６ｍｍｏｌ、０．７８当量）、ＴＥＡ（４００μＬ、５．７ｍｍｏｌ、１．８当量）を加えた。その後、クロロ酢酸無水物（１ｇ、５．９ｍｍｏｌ、１当量）を加え、混合物を６時間撹拌し、ＴＬＣにより完全性についてモニタリングした。その後、反応混合物を真空内で濃縮した。その後、粗製生成物を２回のカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固形物（６１０ｍｇ、７２％）として純粋な表題生成物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， メタノール－ｄ$_{4}$） δ ５．２０ （ｄ， Ｊ ＝ ３．７ Ｈｚ， １Ｈα）， ４．７５ （ｄ， Ｊ ＝ ８．３ Ｈｚ， １Ｈβ）， ４．１９ （ｄｄ， Ｊ ＝ ２０．２， １３．９ Ｈｚ， ２Ｈ）， ４．１９ （ｄ， Ｊ ＝ １２．６ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．９５ （ｄｄ， Ｊ ＝ １０．６， ３．５ Ｈｚ， １Ｈα）， ３．８３ （ｍ， ３Ｈα， ３Ｈβ），３．７４ （ｄ， Ｊ ＝ ５．１ Ｈｚ， １Ｈβ）， ３．７０ （ｄｄ， Ｊ ＝ １１．４， ８．９ Ｈｚ， １Ｈβ）， ３．６０ （ｄｄ， Ｊ ＝ １０．７， ９．５ Ｈｚ， １Ｈβ）， ３．４６ （ｔ， Ｊ ＝ ９．３ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．４２ （ｔ， Ｊ ＝ １０．０ Ｈｚ， １Ｈβ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ Ｃ$_{8}$Ｈ$_{15}$ＣｌＮＯ$_{6}$ ［Ｍ＋Ｈ］：２５６．０５８２；ｆｏｕｎｄ：２５６．０５８２。

【０４７１】

２－クロロ－１－（２－メチル－３，４－ジヒドロキノリン－１（２Ｈ）－イル）エタン－１－オン（４５）

【０４７２】

【化９４】



【０４７３】

クロロアセチルクロリド（８０．４μＬ、０．９ｍｍｏｌ、１．７当量）を、無水ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$（３ｍＬ）中で溶解し、０℃に冷却した。その後、ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$（２ｍＬ）中の２－メチル－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン（８０．１ｍｇ、０．５４４ｍｍｏｌ、１当量）及びＮ－メチルモルホリン（０．１１ｍＬ、１．０ｍｍｏｌ、１．８当量）の溶液を、滴下で加えた。６時間後、反応物を飽和水性ＮａＨＣＯ$_{3}$（５ｍＬ）でクエンチし、ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$（３×１０ｍＬ）で抽出した。組み合わせた有機質層を無水Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$で乾燥し、減圧下で濃縮した。結果として生じる残留物を分取ＴＬＣ（３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）により生成して、オフホワイトの固形物（１０８．８ｍｇ、８９％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．３０－７．１３ （ｍ， ４Ｈ）， ４．８６－４．７５ （ｍ， １Ｈ）， ４．２０ （ｄ， Ｊ ＝ １２．５ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．０９ （ｄ， Ｊ ＝ １２．５ Ｈｚ， １Ｈ）， ２．６９－２．５８ （ｍ， １Ｈ）， ２．５９－２．４６ （ｍ， １Ｈ）， ２．４６－２．３１ （ｍ， １Ｈ）， １．３６－１．２９

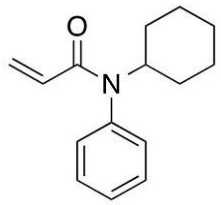
（m, 1H), 1.15 (d, J = 6.5 Hz, 3H)；HRMS－ESI (m／z) calculated for $C_{12}H_{15}ClNO$ [M+H]：224.0837；found：224.0836。

【0474】

Ｎ－シクロヘキシル－Ｎ－フェニルアクリルアミド（４６）

【0475】

【化９５】



【0476】

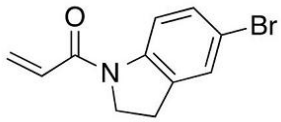
Ｎ－シクロヘキシルアニリン（８９．５ｍｇ、０．５１１ｍｍｏｌ、１当量）から、基本手順Ｃに従い表題化合物を合成した。フラッシュカラムクロマトグラフィー（１０－２０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）、その後分取ＴＬＣ（３０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）による粗製生成物の精製により、オフホワイトの固形物（５３．１ｍｇ、４５％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ, クロロホルム－ｄ） δ 7.42－7.33 (m, 3H), 7.10－7.06 (m, 2H), 6.31 (dd, J = 16.7, 2.1 Hz, 1H), 5.77 (dd, J = 16.7, 10.3 Hz, 1H), 5.41 (dd, J = 10.4, 2.1 Hz, 1H), 4.65 (tt, J = 12.2, 3.7 Hz, 1H), 1.85 (dt, J = 11.2, 1.8 Hz, 2H), 1.75－1.68 (m, 2H), 1.61－1.53 (m, 1H), 1.40 (qt, J = 13.3, 3.6 Hz, 2H), 1.07 (qd, J = 12.4, 3.6 Hz, 2H), 0.91 (qt, J = 13.1, 3.8 Hz, 1H)；HRMS－ＥＳＩ (m／z) calculated for $C_{15}H_{20}NO$ [M+H]：230.1539；found：230.1539。

【0477】

１－（５－ブロモインドリン－１－イル）ｐｒｏｐ－２－エン－１－オン（４７）

【0478】

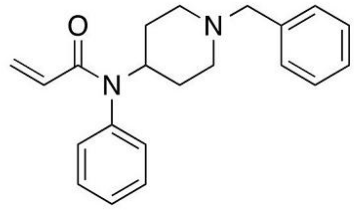
【化９６】



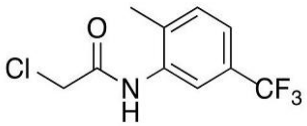
【0479】

５－ブロモインドリン（４１．７ｍｇ、０．２１１ｍｍｏｌ、１当量）、アクリロイルクロリド（３２μＬ、０．４０ｍｍｏｌ、１．９当量）から、基本手順Ｃに従い、且つ塩基をピリジン（３２μＬ、０．４０ｍｍｏｌ、１．９当量）に変更して、表題化合物を合成した。ＥｔＯＡｃからの再沈殿による粗製生成物の精製によって、白色固形物（６７．８ｍｇ、６４％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ, クロロホルム－ｄ） δ 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.33－7.25 (m, 2H), 6.60－6.42 (m, 2H), 5.84－5.76 (m, 1H), 4.15 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 3.17 (t, J = 8.6 Hz, 2H)；HRMS－ＥＳＩ (m／z) calculated for $C_{11}H_{11}BrNO$ [M+H]：252.0018；found：252.0017。

【０４８０】
Ｎ－（１－ベンジルピペリジン－４－イル）－Ｎ－フェニルアクリルアミド（４８）
【０４８１】
【化９７】

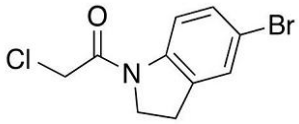


【０４８２】
１－ベンジル－Ｎ－フェニルピペリジン－４－アミン（３０．０ｍｇ、０．１１３ｍｍｏｌ、１当量）、アクリロイルクロリド（１７μＬ、０．２１ｍｍｏｌ、１．９当量）から、基本手順Ｃに従い、且つ塩基をピリジン（１７μＬ、０．２１ｍｍｏｌ、１．９当量）に変更して、表題化合物を合成した。分取ＴＬＣによる粗製生成物の精製によって、白色固形物（２２．５ｍｇ、６４％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）　δ　７．６２－７．５６　（ｍ，　２Ｈ），　７．４３－７．３６　（ｍ，　６Ｈ），　７．０５　（ｄ，　Ｊ　＝　６．２　Ｈｚ，　２Ｈ），　６．２９　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１６．８，　２．１　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．７９　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１６．８，　１０．３　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．４６　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１０．３，　２．１　Ｈｚ，　１Ｈ），４．８１－４．７０　（ｍ，　１Ｈ），　４．０９　（ｓ，　２Ｈ），　３．４１　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．０　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．８２　（ｑ，　Ｊ　＝　１１．５　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．２１　（ｑ，　Ｊ　＝　１１．９　Ｈｚ，　２Ｈ），　１．９４　（ｄ，　Ｊ　＝　１４．２　Ｈｚ，　２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　（ｍ／ｚ）　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{21}H_{25}N_2O$［Ｍ＋Ｈ］：３２１．１９６１；ｆｏｕｎｄ：３２１．１９６２。
【０４８３】
２－クロロ－Ｎ－（２－メチル－５－（トリフルオロメチル）フェニル）アセトアミド（４９）
【０４８４】
【化９８】



【０４８５】
２－メチル－５－（トリフルオロメチル）アニリン（３５．０ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ、１当量）から、基本手順Ａ１に従い表題化合物を合成した。分取ＴＬＣ（２０％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）による粗製生成物の精製によって、白色固形物（４８．２ｍｇ、９５％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（６００　ＭＨｚ，　クロロホルム－ｄ）　δ　８．３１　（ｓ，　１Ｈ），　８．２５　（ｄ，　Ｊ　＝　１．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．３７　（ｄｄ，　Ｊ　＝　７．９，　１．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．３２　（ｄ，　Ｊ　＝　７．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　４．２５　（ｓ，　２Ｈ），　２．３６　（ｓ，　３Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　ｆｏｒ　$C_{10}H_{10}ClF_3NO$　［Ｍ＋Ｈ］：２５２．０３９７；ｆｏｕｎｄ：２５２．０３９７。
【０４８６】
１－（５－ブロモインドリン－１－イル）－２－クロロエタン－１－オン（５０）
【０４８７】

【化９９】



【０４８８】

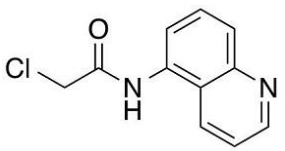
５－ブロモインドリン（３９．６ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ、１当量）から、表題化合物を基本手順Ａ１に従い合成した。分取ＴＬＣ（２５％のＥｔＯＡｃ／ヘキサン）による粗製生成物の精製によって、オフホワイトの固形物（４８．６ｍｇ、８９％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （６００ ＭＨｚ， ＣＤＣｌ$_{3}$） δ ８．０７ （ｄ，Ｊ ＝ ８．４ Ｈｚ， １Ｈ）， ７．３２ （ｄ，Ｊ ＝ ８．８ Ｈｚ， ２Ｈ），４．１７ （ｔ，Ｊ ＝ ８．６ Ｈｚ， ２Ｈ），４．１４ （ｓ，２Ｈ），３．２２ （ｔ，Ｊ ＝ ８．４ Ｈｚ， ２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ Ｃ$_{10}$Ｈ$_{10}$ＢｒＣｌＮＯ ［Ｍ＋Ｈ］：２７３．９６２９；ｆｏｕｎｄ：２７３．９６２９。

【０４８９】

２－クロロ－Ｎ－（キノリン－５－イル）アセトアミド（５１）

【０４９０】

【化１００】



【０４９１】

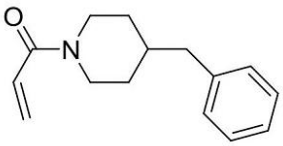
０℃で無水ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$（３ｍＬ）中の、５－アミノキノリン（２８．８ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ、１当量）及び炭酸カリウム（８２．９ｍｇ、０．６ｍｍｏｌ、３当量）の撹拌懸濁液に、クロロアセチルクロリド（２４μＬ、１．５の当量）を加えた。反応物を室温にまでゆっくりと暖めた。３時間後、混合物を濾過し、ＥｔＯＡｃ（１０ｍＬ）及びＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$（１０ｍＬ）で洗浄した。その後、固形のケーキをＭｅＯＨ（２０ｍＬ）で溶出し、濾液を真空内で濃縮した。残留物を１０％のＭｅＯＨ／ＣＨ$_{2}$Ｃｌ$_{2}$の中で取り上げ、シリカのパッドに通して、オフホワイトの固形物（４２．６ｍｇ、８２％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， ＣＤＣｌ$_{3}$） δ ８．９６ （ｄ，Ｊ ＝ ２．５ Ｈｚ， １Ｈ），８．７１ （ｓ，１Ｈ），８．２０ （ｄ，Ｊ ＝ ８．６ Ｈｚ， １Ｈ），８．０４ （ｄ，Ｊ ＝ ８．５ Ｈｚ，１Ｈ），７．９４ （ｄ，Ｊ ＝ ７．５ Ｈｚ， １Ｈ），７．７４ （ｔ，Ｊ ＝ ８．０ Ｈｚ， １Ｈ），７．４８ （ｄｄ，Ｊ ＝ ８．５，４．２ Ｈｚ， １Ｈ），４．３５ （ｓ，２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ Ｃ$_{11}$Ｈ$_{9}$ＣｌＮ$_{2}$Ｏ ［Ｍ＋Ｈ］：２２１．０４７６；ｆｏｕｎｄ：２２１．０４７７。

【０４９２】

１－（４－ベンジルピペリジン－１－イル）ｐｒｏｐ－２－エン－１－オン（５３）

【０４９３】

【化１０１】



【０４９４】

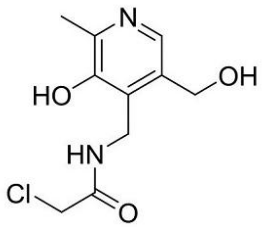
基本手順Ｂに従い、４－ベンジルピペリジン（１ｇ、５．７ｍｍｏｌ、１当量）から出発して、表題化合物を黄色の油（７４８ｍｇ、５７％）としてカラムクロマトグラフィーの後に得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ，クロロホルム－ｄ） δ ７．３６（ｔ，Ｊ ＝ ７．４ Ｈｚ，２Ｈ），７．２８（ｔ，Ｊ ＝ ７．４ Ｈｚ，１Ｈ），７．２０（ｄ，Ｊ ＝ ７．１ Ｈｚ，２Ｈ），６．６４（ｄｄ，Ｊ ＝ １６．８，１０．６ Ｈｚ，１Ｈ），６．３２（ｄｄ，Ｊ ＝ １６．８，１．９ Ｈｚ，１Ｈ），５．７２（ｄｄ，Ｊ ＝ １０．６，１．９ Ｈｚ，１Ｈ），４．７２（ｄ，Ｊ ＝ １２．７ Ｈｚ，１Ｈ），４．０３（ｄ，Ｊ ＝ １３．０ Ｈｚ，１Ｈ），３．０５（ｔ，Ｊ ＝ １２．７ Ｈｚ，１Ｈ），２．７０－２．５９（ｍ，３Ｈ），１．８６（ｄｄｐ，Ｊ ＝ １４．６，７．２，３．５ Ｈｚ，１Ｈ），１．７７（ｍ，２Ｈ），１．３７－１．１８（ｍ，２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ（ｍ／ｚ）ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{15}H_{20}ClNO$ ［Ｍ＋Ｈ］：２３０．１５３９；ｆｏｕｎｄ：２３０．１５３９。

【０４９５】

２－クロロ－Ｎ－（（３－ヒドロキシ－５－（ヒドロキシメチル）－２－メチルピリジン－４－イル）メチル）アセトアミド（５４）

【０４９６】

【化１０２】



【０４９７】

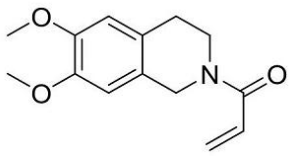
室温で無水ＭｅＯＨ（２０ｍＬ）中のピリドキサミン塩酸塩（１５０ｍｇ、０．６４ｍｍｏｌ、１当量）の撹拌溶液に、ナトリウム金属（３０ｍｇ、１．５ｍｍｏｌ、２．３当量）、ＴＥＡ（１００μＬ、１ｍｍｏｌ、１．６当量）を加えた。クロロ酢酸無水物（３９０ｍｇ、２．２９ｍｍｏｌ、３．５当量）を加え、混合物を６時間撹拌し、ＴＬＣにより完全性についてモニタリングした。その後、反応混合物を真空内で濃縮した。その後、粗製生成物を分取ＴＬＣにより精製して、白色固形物（４６ｍｇ、３０％）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ，メタノール－d_4） δ ７．９７（ｓ，１Ｈ），４．８１（ｓ，２Ｈ），４．６１（ｓ，２Ｈ），４．１７（ｓ，３Ｈ），４．０６（ｓ，１Ｈ），３．３５（ｓ，１Ｈ），２．５２（ｓ，３Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ（ｍ／ｚ）ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{10}H_{14}ClN_2O_3$ ［Ｍ＋Ｈ］：２４５．０６８７；ｆｏｕｎｄ：２４５．０６８８。

【０４９８】

１－（６，７－ジメトキシ－３，４－ジヒドロイソキノリン－２（１Ｈ）－イル）ｐｒｏｐ－２－エン－１－オン（５６）

【０４９９】

【化１０３】



【０５００】

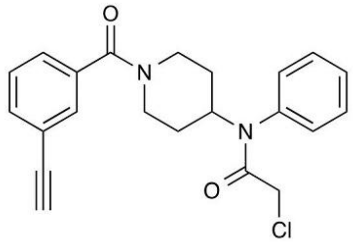
０℃で無水ＴＨＦ（１０ｍＬ）中の６，７－ジメトキシ－３，４－ジヒドロイソキノリン（１ｇ、５．２ｍｍｏｌ、１当量）及びＴＥＡ（１８００μＬ、１２．６ｍｍｏｌ、２．５当量）の撹拌懸濁液に、アクリロイルクロリド（１３２０μＬ、１３．２ｍｍｏｌ、２．６当量）を加え、反応物を室温にまでゆっくり暖めた。２時間後、混合物をCH_2Cl_2（２×５０ｍＬ）で希釈し、飽和ブライン（２×５０ｍＬ）で洗浄し、組み合わせた有機物を真空内で濃縮した。残留物を１０％のＭｅＯＨ／CH_2Cl_2の中で取り上げ、カラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固形物（７００ｍｇ、５４％、Ｅ／Ｚ異性体の混合物）として表題化合物を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （５００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ６．６３ （ｍ， ３Ｈ）， ６．２９ （ｄ， Ｊ ＝ １６．８ Ｈｚ， １Ｈ）， ５．６９ （ｄｄ， Ｊ ＝ １０．６， １．８ Ｈｚ， １Ｈ）， ４．６９ （ｓ， １Ｈ ［ｍａｊｏｒ］）， ４．６３ （ｓ， ０．８Ｈ ［ｍｉｎｏｒ］）， ３．８２ （ｓ， ７Ｈ）， ３．７３ （ｔ， Ｊ ＝ ５．６ Ｈｚ， １Ｈ）， ２．８４－２．７７ （ｍ， ２Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ $C_{14}H_{18}NO_3$ ［Ｍ＋Ｈ］：２４８．１２８；ｆｏｕｎｄ：２４８．１２８１。

【０５０１】

２－クロロ－Ｎ－（１－（３－エチニルベンゾイル）ピペリジン－４－イル）－Ｎ－フェニルアセトアミド（６１）

【０５０２】

【化１０４】



【０５０３】

過剰量のきれいなＳＩ－３に、０．７ｍＬのトリフルオロ酢酸（０．２Ｍ）を加えた。これ以上蒸発が観察されなくなるまで結果として生じる溶液を窒素の流れの下で濃縮し、そのトリフルオロ酢酸塩として脱保護されたアミンを得た。トリフルオロアセテートアミン塩（９０．６ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（０．５ｍＬ、０．５Ｍ）の中で取り上げ、結果として生じる溶液を０℃に冷却した。３－エチニル安息香酸（４４ｍｇ、１．２当量）、ＨＡＴＵ（１１３ｍｇ、１．２当量）、及びヒューニッヒ塩基（８６μＬ、２当量）を連続で加えた。反応物を０℃で２時間撹拌し、Et_2Oで希釈し、次いで１ＭのＨＣｌで洗浄した。有機質層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー（ヘキサン中で４０から７０％の酢酸エチルの勾配）により精製して、表題化合物（８７ｍｇ、９２％）を得た。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ ＭＨｚ， クロロホルム－ｄ） δ ７．５１ （ｄｄ， Ｊ ＝ ９．５， ５．４ Ｈｚ， ４Ｈ）， ７．４３ （ｄ， Ｊ ＝ １．９ Ｈｚ， １Ｈ）， ７．３９－７．２５ （ｍ， ２Ｈ）， ７．１４ （ｄ， Ｊ ＝ １０．４ Ｈｚ， ２Ｈ）， ４．８６ （ｔｔ， Ｊ ＝ １５．１， ５．３ Ｈｚ， ２Ｈ）， ３．７２ （ｓ， ３Ｈ）， ３．１９ （ｄ，Ｊ ＝ １４．０ Ｈｚ， １Ｈ）， ３．１１ （ｓ， １Ｈ）， ２．８６ （ｓ， １Ｈ）， １．９０ （ｄ， Ｊ ＝ ３６．６ Ｈｚ， ２Ｈ）， １．３８ （ｓ， １Ｈ）， １．２４ （ｄ， Ｊ ＝ １９．９ Ｈｚ， １Ｈ）；ＨＲＭＳ－ＥＳＩ （ｍ／ｚ） ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ ｆｏｒ Ｃ２２Ｈ２２ＣｌＮ２Ｏ２ ［Ｍ＋Ｈ］：３８１．１３６４；ｆｏｕｎｄ：３８１．１３６３。

【０５０４】

未変性の集団におけるシステインに反応的な断片の全体的なプロファイリング

システインは、その高い求核性、及び酸化的修飾に対する感度に起因して、タンパク質

をコードするアミノ酸の中で固有なものである。システイン残基は、多様な酵素の分類において触媒機能を実行し、ジスルフィド結合、鉄－硫黄のクラスター形成、スルフィン酸及びスルホン酸への変換、ニトロシル化、Ｓ－グルタチオン化、及び脂質修飾を通じたタンパク質の翻訳後の調節のための部位を表わす。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ（ｉｓｏｔｏｐｉｃ　Ｔａｎｄｅｍ　Ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ　Ｐｒｏｔｅｏｌｙｓｉｓ－Ａｃｔｉｖｉｔｙ－Ｂａｓｅｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ）と称される、定量的で化学的なプロテオミクス方法を使用して、システイン残基の固有の反応の全体的な測定を行い、脂質由来の求電子による修飾に対するそれらの感度を評価した。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰが、未変性の生物系における共有結合性のＦＢＬＤを実行するように適合されるかどうかを判定するために、細胞調製物（溶解物又は無傷細胞）を、ＤＭＳＯ、又は求電子性の小分子断片のライブラリーの一員で予め処理し、次に、広域スペクトルのシステイン反応性プローブヨードアセトアミド（ＩＡ）－アルキン１にさらした（図１Ａ）。ＤＭＳＯ及び断片で処理したサンプルからのＩＡ－アルキンで標識されたシステイン残基を持つタンパク質を、同位体的に分化されたアジド－ビオチンのタグ（それぞれ重及び軽）へと、銅触媒のアジド－アルキンの環化付加（ＣｕＡＡＣ又はクリック）の化学により結合させ、組み合わせ、ストレプトアビジンにより富化し、ビーズ上でタンパク分解性に消化して、ＬＣ－ＭＳにより分析された同位体のペプチド対を得た。ペプチド対のためのＭＳ１クロマトグラフィーのピーク比の定量化は、ＤＭＳＯ／断片の比較において、断片競合化（ｆｒａｇｍｅｎｔ－ｃｏｍｐｅｔｅｄ）システイン残基を、高い競合比率又はＲ値を表示するものであると確認した。

【０５０５】

５０＋のメンバーの断片ライブラリーを、クロルアセトアミド又はアクリルアミドの求電子（図１Ｂ及び図３）の何れかを含む大半の化合物で構築され、これらは、多くの化学プローブ及び一部の臨床的に承認された薬物に見出される、十分に特徴づけられたシステインに反応的な群である。これらの求電子を、ヒトのプロテオームの異なる亜群との相互作用を促進する認識要素として機能するように意図される、構造上多様な小分子断片（＜３００ｄａ）に付加した。ライブラリーはまた、シアノアクリルアミド及びビニルスルホンアミドなどの幾つか追加の求電子、並びに、既知の生物活性の求電子性化合物（例えば、抗癌剤であるピペルロングミン（ｐｉｐｅｒｌｏｎｇｕｍｉｎｅ）及び抗遊走性薬剤（ａｎｔｉ－ｍｉｇｒａｔｏｒｙ　ａｇｅｎｔ）であるロコスタチン（ｌｏｃｏｓｔａｔｉｎ））を含んでいた（図１Ｂ及び図３）。求電子ライブラリーを、典型的なＦＢＬＤ実験に使用されるリガンド濃度に匹敵する高濃度（５００μＭ）でスクリーンした。断片ライブラリーの亜群を、ＩＡ－ローダミンプローブ１６を使用して、ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞株プロテオームにおける競合的なプロファイリングにより最初に分析して、システイン反応事象の容易なＳＤＳ－ＰＡＧＥ検出を可能にした。この実験は、１つ以上の断片の存在下でのＩＡ－ローダミンの標識化の減少を示した、様々なタンパク質を同定した（図１Ｃ、アスタリスク）。興味深いことに、タンパク質は、試験断片のセットにわたって別個のＳＡＲを示し、このことは、ライブラリーの認識要素が特異的な断片－タンパク質反応性事象に対し強い影響を及ぼすことを示している。

【０５０６】

競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを使用して、断片求電子により標的とされるこれらタンパク質内でヒトタンパク質及びシステイン残基を大域的にマッピングした。各断片を、通常、２つの別個のヒト癌細胞プロテオーム（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１及びＲａｍｏｓ細胞）に対して試験し、大半の断片を、これらプロテオームの少なくとも１つに対して２通りにスクリーンした。平均で、９２７のシステインを１つのデータセットごとに定量化し、個々のシステインを説明のために少なくとも３つのデータセットにおいて定量化することを要求した。これらの標準に基づいて、２８８５のタンパク質から６１５７を超えるシステインを、１つのシステイン当たり２２のデータセットの平均定量化周波数を持つ全てのデータセットにわたり集合体の中で定量化した（図４Ａ）。断片競合的なシステイン残基、又は「リガンド結合された」システインを、ＩＡ－アルキン標識化において≧７５％の

減少を示すものとして定めた（ＤＭＳＯ／断片についてＲ値≧４）。偽陽性の可能性を最小限にするために、２つ以上のデータセットにおいてＲ値≧４を示し、且つデータ品質管理の追加の基準を満たしたシステインのみを、断片求電子の標的と見なした。その後、個々の断片のプロテオミクス反応値、又はリガンド結合したシステインの割合を、その断片上で実行されるｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験におけるリガンド結合した／合計の定量化したシステインのパーセンテージとして計算した。

【０５０７】

大半の断片求電子は、ライブラリーについて３．８％の中央のリガンド結合したシステインの割合で、ヒトプロテオームにわたり調節された反応を示した（図４Ｂ）。しかし、反応における実質的な差異を観察し、個々の求電子は＜０．１％のリガンド結合したシステインの割合を示し、その他は＞１５％の割合を表示した（図４Ｂ）。ピペルロングミン及びロコスタチンが後者の分類へと分けられることは、断片求電子の固有のプロテオミクス反応が通常、前述の求電子性プローブのものを超過しなかったことを示した。断片の亜群をまた、より低い濃度（２５－５０μＭ）でスクリーンし、これにより、それらのプロテオミクス反応が濃度依存性であることを確認した（図４Ｃ）。断片求電子の相対反応性は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１及びＲａｍｏｓ細胞のプロテオームにおいて同様であり（図４Ｄ）、このことは、このパラメータが化合物の固有特性であることを示している。生物学的な複製の実験で分析した時、断片は一貫した反応特性も示した（図４Ｅ）。興味深いことに、断片求電子のプロテオミクス反応は、タンパク質性のシステイン反応の測定のための、共通して使用される代用アッセイである、それらのグルタチオンの内転（ａｄｄｕｃｔｉｏｎ）の可能性と僅かにしか関連していないことが分かった（図４Ｆ）。このような差は、断片求電子の認識要素の、それらの相互作用、及び最終的にタンパク質との反応性に対する影響に起因する。

【０５０８】

断片３、１４、１７、及び２３－２６の比較は、共通の認識要素（３，５－ジ（トリフルオロメチル）フェニル基）に結合される異なる求電子性の基の相対的なプロテオミクス反応への見識をもたらした。クロロアセトアミド３は、アクリルアミド１４よりも大きな反応を示し（それぞれ、１５％対３．４％のリガンド結合したシステイン；図１Ｄ）、シアノアクリルアミド２３は、アクリルアミド１４及びその他に対する同様の反応を示し、より立体的に充満した求電子（２４－２６）はプロテオミクス反応の減少を示している（図４Ｇ）。重要なことに、非求電子性のアセトアミド対照の断片１７は、競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験においてごくわずかな活性を示し（リガンド結合したシステインの割合＜０．２％）、このことは、検出された断片－システイン相互作用の大部分が共有結合反応対非共有結合事象を反映したことを示している（図１Ｄ）。また、この結論の支持において、３及び１４（それぞれ化合物１９及び１８）の「クリック可能な」アルキンアナログは、競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において３及び１４により表示されるそれぞれのリガンド結合したシステインの割合を映す（３＞１４；図１Ｄ）、異なる濃度依存性のプロテオーム標識化特性（１９＞１８；図１Ｅ）を示した。アクリルアミド１４及びシアノアクリルアミド２３に対するクロロアセトアミド３のより大きな全体的なプロテオミクス反応にもかかわらず、システインの明確な例は、後者の断片により優先的にリガンド結合されたことが分かった（図１Ｆ）。

【０５０９】

幾つかの例において、これらの発見により、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰのプラットフォームは、未変性のプロテオームにおける数千のシステイン残基に対して断片求電子の特性を競合的に明らかにするための使用のための１つの方法であることが、実証された。

【０５１０】

未変性のプロテオームにおける断片求電子により標的とされるシステイン

組み合わせた全てのｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰのデータセットにわたり、７５８のリガンド結合したシステインを、それぞれ合計の定量化されたシステイン及びタンパク質の～１２及び２２％に相当する６３７の別個のタンパク質上で同定した（図５Ａ及び表１－３）

。リガンド結合したシステインを持つタンパク質の適度の断片のみがＤｒｕｇＢａｎｋのデータベースにおいて見出され（１５％；図５Ｂ）、このことは、断片求電子が小分子プローブを欠く多くのタンパク質を標的としたことを示している。既知の共有結合のリガンドを持つタンパク質標的の中で、断片求電子は頻繁に、このような既知のリガンドと同じシステイン残基を標的とし（表４）；例として、求電子性断片が制癌剤であるイブルチニブとも反応する活性部位システインを標的としたタンパク質キナーゼＢＴＫ、及び、求電子性断片が生物活性の天然の生成物及び候補の抗癌剤により修飾される保存されたシステインを標的としたＸＰＯ１とＥＲＣＣ３が、挙げられる。ＢＴＫの場合、このキナーゼとのイブルチニブの相互作用が、Ｒａｍｏｓ細胞溶解物において既知のイブルチニブオフターゲット－ＭＡＰ２Ｋ７－も同定した、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより検出されたことを確認した（図７Ａ）。

【０５１１】

リガンド結合したシステインを含むＤｒｕｇＢａｎｋのタンパク質の大半は、酵素、チャネル、及び輸送体を含む、「ドラッガブル」と見なされる分類から生じた（図５Ｃ）。他方、リガンド結合したシステインを含む非ＤｒｕｇＢａｎｋのタンパク質は、小分子リガンドで標的を負荷すると考慮される、転写因子及びアダプター／スキャフォールディングタンパク質などのタンパク質を含んでいた、より広範囲の分類の分布を示した（図５Ｃ）。断片求電子により標的とされた酵素の中でさえ、リガンド結合したシステインが非活性部位の残基であった多くの例が、注目された（図７Ｂ）。これらのデータは、断片求電子により修飾されるシステインがタンパク質上の古典的なリガンド結合ポケットに制限されないことを示した。また、この前提と一貫して、リガンド結合したシステインの全てのうち～６％のみを、活性部位残基として機能的に注釈した（図５Ｄ）。しかし、活性部位システインに加え、レドックス活性システインも、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより定量化されるリガンド結合されていないシステインと比較して、リガンド結合したシステイン基の中で実質的に豊富であった（図５Ｄ）。活性部位及びレドックス活性のシステインが通常、他のシステインと比較してより大きな固有の反応性（ＩＡ－アルキンプローブで測定されるような）も示すことが、以前に分かっている。断片求電子の標的として検出された過反応性システインの高い比率で反映されるように（図５Ｅ）、この増大した反応性はシステインのリガンド結合可能性に寄与する可能性の高い要因である一方、リガンド結合したシステインはまた、広範囲の固有の反応性にわたり十分に表示される（図５Ｅ）。最終的に、大半のタンパク質は、平均でｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより１つのタンパク質ごとに定量化された様々なシステインの中で単一のリガンド結合したシステインを持つことが分かった。核外輸送因子ＸＰＯ１及び代謝性酵素ＰＨＧＤＨは、タンパク質内の個々のシステインのための断片求電子により表示された選択性の説得力のある例を提供する（図５Ｇ及び図７Ｃ）。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより定量化される６つの異なるＸＰＯ１システイン残基の中で、単一のシステインとしてＣ５２８は頻繁に断片求電子により標的とされ（図５Ｇ）、この残基はまた、癌[40]のための臨床開発における求電子性の薬物により修飾される。同様に、ＰＨＧＤＨにおける８つの定量化されたシステインの中で、Ｃ３６９、非活性部位残基のみが、求電子性断片により標的とされた（図７Ｃ）。

【０５１２】

リガンド結合したシステインは、断片求電子ライブラリーで著しく異なるＳＡＲを表示した（図６Ａ及び表１－３）。少数のシステインは多数の断片（＞５０％）により標的とされたが、大半のシステインは更に制限された反応性を示した（図６Ａ、Ｂ、及び表１－３）。断片求電子の、それらの相対的なプロテオミクス反応値（群Ａ、＞１０％；群Ｂ、＜１０％）に基づいた操作上のグループ化は、システイン－求電子の相互作用の認識及び反応性の成分の両方を強調したＳＡＲの特徴を明らかにした。例えば、特定のシステインは、あまり反応性でない（群Ｂ）断片（例えば、ＧＬＲＸ５；ＭＳＴＯ１；ＳＲＰ９；ＵＣＨＬ３；図６Ａ）と優先的に相互作用し、一方でその他は、最も反応的な（群Ａ）断片（例えば、ＡＴＸＮ７Ｌ３Ｂ；ＣＲＫＬ；Ｃ２ＯＲＦ４９；図６Ａ）により主にリガンド結合されるが、このような場合でさえ、相互作用は群Ａの断片にわたり実質的に異なって

いた。タンパク質の活性部位にあるリガンド結合したシステインは、他のシステインと比較して断片求電子とのより広範囲の反応を示す傾向があり（図６Ｃ）、このことは恐らく、それらのより大きなリガンド結合可能性を反映しているが、明らかなＳＡＲが多くの非活性部位システインについて観察され、これら残基が群Ａの断片により不釣り合いに標的とされなかった（図６Ｄ）。異なるタンパク質の分類にわたり適用されるこのような原理は、キナーゼにおいて十分に例証され、そのため、活性及び非活性部位の残基間でほぼ均一に分布した、＞２０のリガンド結合したシステインが同定された（図７Ｄ－Ｆ）。転写因子／制御因子などの、薬物に対する負荷と考慮されるタンパク質中に見出されるシステインでさえ、結合性及び反応性の両方に関与する明瞭な相互作用を示す、異なるＳＡＲを示した（図６Ｄ及び図９Ｇ）。加えて、リガンド結合したシステインの６０％より多くについて、求電子（ＩＡ－アルキン又は断片）反応性をプロテオームの熱変性により遮断し、その一方で、リガンド結合されていないシステインの画分（約２０％）について、熱変性後にＩＡ－アルキン標識化の減少を示した（図１５及び１６）。幾つかの例において、これらの結果により、リガンド－システインの相互作用は、タンパク質中のリガンド及び構造化された部位の群の両方に依存するという点で特異的であることが、示された。

【０５１３】

リガンド結合したシステインを持つタンパク質の亜群の三次元構造の利用可能性は、ドッキングが断片求電子反応性の部位を予測するかどうかを試験する機会をもたらした。共有結合性のドッキングプログラムが近年、タンパク質中で予め特定されたシステインを標的とするリガンドを発見するように導入され；しかし、ここでの目的は、タンパク質内の全てのシステインの相対的なリガンド結合可能性を計算的に評価し、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験で獲得したデータにこれらの出力を一致させることであった。先ず、２９の典型的なタンパク質標的を走査し、９９の溶媒露出のシステインを同定した。その後、断片求電子ライブラリーを、アルキル化事象に先行する非共有結合性の相互作用をシミュレートするために修飾された電位（ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）を独立して使用して、各残基上でドッキングした。断片求電子が好ましくはシステインの付近で結合され、且つ反応基がシステインの共有結合距離内にあった場合、システインは断片により修飾されると考慮された。その後、ドッキングスコアを、そのドッキングされたポーズにおける各断片の推定された相互作用エネルギーに基づいて計算し、これら予測の順位付けは、２９のシステムのうち１９のシステムにおける実験データと一致した（即ち、上位の予測されたリガンド結合可能なシステインが、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより判定されるリガンド結合したシステインに一致する場合）（図６Ｅ、Ｆ、及び表５）。残りの１０のシステムのうち６つにおいて、リガンド結合したシステインを、反応的なドッキングにより２番目に順位を付けた。残りの４つのシステムにおいて、反応的なドッキングは、使用されるモデルにおけるドッキングのスコア付けの機能又は構造的な問題における制限が原因で、リガンド結合したシステインを予測することはできなかった。著しいことに、反応的なドッキングにより評価される２９のタンパク質全体にわたり、リガンド結合可能であると予測されるシステインは、リガンド結合可能でないと予測されるシステインと比べて、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより検出される可能性が非常に高いことが分かった（図６Ｅ及び図７Ｈ）。また、リガンド結合可能であると予測されるシステインは、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより検出された可能性が高く、感熱性のＩＡ－アルキン反応性を示したことも、分かった（図１７Ａ及び図１７Ｂ）。これらの結果により、反応的なドッキングは、タンパク質性のシステインのリガンド結合可能性の優れた全体的な予測をもたらすことが示され、且つ、ＩＡ－アルキン反応性自体がタンパク質中で潜在的にリガンド結合可能なシステインを指定するのに有用な独立した実験パラメータを提供することが示唆された。

【０５１４】

リガンド－システインの相互作用の機能分析

次の工程は、組換え型タンパク質を使用するｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによりマッピングされたリガンド－システインの相互作用の機能的な影響を確認且つ判定することであった。リガンド結合したシステインの機能的な有意性が以前に実証された、２つのタンパク質

を選択した。タンパク質メチルトランスフェラーゼＰＲＭＴ１は、４－ヒドロキシノネナール（ＨＮＥ）のような求電子性の小分子により修飾された時、ＰＲＭＴ１活性２７の阻害を結果としてもたらす、非触媒性の活性部位システイン（Ｃ１０９）を持つ。競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰは、ＰＲＭＴ１のＣ１０９のリガンド結合のための非常に選択的なＳＡＲを明らかにし、３つの断片（２、１１、及び５１）だけが、この残基のＩＡ－アルキン標識化を遮断した（図６Ａ及び図８Ａ及び表１－３）。ＰＲＭＴ１における様々な追加のシステインをｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において定量化したとしても（いずれも試験された断片求電子に対する感度を示さなかった；図８Ａ及び表１－３）、組換え型ＰＲＭＴ１のＩＡ－ローダミン標識化はセリンへのＣ１０９の突然変異により遮断されたことが分かった（図８Ｂ）。これらのデータは、Ｃ１０９がＰＲＭＴ１において最も反応性のシステインであり、且つ低濃度の求電子性プローブにより選択的に標識されることを示す、過去の研究と一貫している。都合のよいＳＤＳ－ＰＡＧＥの読み出しを使用して、断片１１が、３６μＭのＩＣ$_{50}$値を持つＰＲＭＴ１のＩＡ－ローダミン標識化を遮断した一方で、１１に対する同様の全体的なプロテオーム反応性を示すにも関わらず（図４Ｂ）、対照の断片３は不活性であった（図８Ｂ、Ｃ）ことを確認した。３ではなく１１での前処理はまた、Ｃ１０９に依存した方式でヒストン４のＰＲＭＴ１で触媒されるメチル化を阻害した（図８Ｄ）。これらのデータは、Ｃ１０９を標的とするその求電子性リガンドがＰＲＭＴ１阻害剤として作用することを示す。

【０５１５】

その後、酸化ストレスの条件下でＪＮＫ経路をフィードバック阻害するためにＨＮＥにより修飾される活性部位の近位のシステイン残基Ｃ２２を持つＭＡＰ３キナーゼである、ＭＬＴＫ又はＺＡＫを調べた。ＭＬＴＫは近年、胃癌における発癌性のドライバーとしても関与され、且つ、ＭＬＴＫのＣ２２と反応するイブルチニブのためのオフターゲットである。競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験により、ＭＬＴＫにおけるＣ２２のＩＡ－アルキン標識化を遮断した断片求電子の亜群を同定した（図９Ａ及び表１－３）。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより提供されるＳＡＲを検証し、イブルチニブ由来の活性プローブを使用して組換え型ＭＬＴＫの標識化の遮断のために断片を試験することにより拡張して（図８Ｅ及び図９Ｂ）、ＭＬＴＫの阻害のための優れた潜在能を持つものとしてベンゾフランの断片６０（２．６μＭのＩＣ$_{50}$値）、及び、不活性の対照プローブとして断片３（図８Ｅ、Ｆ、及び図９Ａ、Ｂ）を同定した。断片３ではなく、断片６０はまた、基質リン酸化アッセイを使用してＭＬＴＫの触媒活性を遮断し、この阻害効果は、Ｃ２２Ａ－ＭＬＴＫ突然変異体では観察されなかった（図８Ｇ及び図１８）。

【０５１６】

次に、以前に特徴化されていないリガンド結合したシステインを有していたタンパク質を評価した。グアニンヌクレオチドの新規合成における律速酵素であり、且つ免疫細胞増殖及び癌を調節する、ＩＭＰＤＨ２は、競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において重複しているが異なるＳＡＲを示した２つのリガンド結合したシステイン－Ｃ１４０及びＣ３３１－を含んでいた（図９Ｃ、Ｄ；図１９及び表１－３）。Ｃ３３１は、触媒性の求核分子として機能し、ＩＭＰＤＨ２の活性部位特異的な阻害剤を記載した。他方、Ｃ１４０をＩＭＰＤＨ２の別個のＢａｔｅｍａｎドメインにおいて見出し、これは、ヌクレオチドの感知によりアロステリック調節のためのモジュールとして機能し（図９Ｄ）、求電子性小分子と反応することは示されていない。それ故、Ｃ１４０の特徴づけに重点を置いた。最初に、断片１４は、ＭＳ方法により組換え型ＩＭＰＤＨ２のＣ１４０を直接標識したことを確認した（表６）。その後、１４のアルキンアナログ（１８；図８Ｈ）を合成し、これにより、ローダミン－アジドのタグへのクリックケミストリー結合（ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）及びＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によってＣ１４０でのリガンドの相互作用を直接モニタリングする手段をもたらした。クリックプローブ１８はＷＴ－ＩＭＰＤＨ２及びＣ３３１Ｓ－ＩＭＰＤＨ２突然変異体を標識したが、Ｃ１４０Ｓ又はこの酵素のＣ１４０Ｓ／Ｃ３３１Ｓ突然変異体は標識しなかった（図８Ｈ）。このアッセイを使用して、対照の断片８ではなく１４が、１８によるＩＭＰＤＨ２の標識化

を阻害したことを確認した（図９Ｅ）。１８によるＩＭＰＤＨ２標識化はまた、ヌクレオチドＡＴＰ、ＡＭＰ、及びＧＴＰにより阻害されたが、ＵＴＰ又はＩＭＰでは阻害されなかった（図８Ｉ及び図９Ｆ）。ＡＴＰは、４５μＭのＩＣ$_{50}$値でＩＭＰＤＨ２の１８の標識化を遮断した（図８Ｊ）。故に、ＩＭＰＤＨ２のＢａｔｅｍａｎドメインを標的とする共有結合性のリガンドは、阻害剤としてだけでなく、この酵素へのヌクレオチド結合のプローブとしても機能する。

【０５１７】

２つのリガンド結合したシステインであるＣ１１４及びＣ１６１はまた、ｐ５３で誘導されたホスファターゼＴＩＧＡＲにおいて同定された（図９Ｇ、Ｈ）。幾つかの例において、ＴＩＧＡＲは、癌細胞の代謝状態を形成し且つそれらをＲＯＳで誘導された細胞死から保護するために、フルクトース－２，６－ビスホスファターゼ及び２，３－ビスホスホグリセラートホスファターゼの両方として作用する。ＴＩＧＡＲの阻害剤は記載しない。Ｃ１１４は、リン酸塩基質結合部位から～１５Åの、ＴＩＧＡＲ活性部位の蓋（ｌｉｄ）の上で見出される（図９Ｈ）。Ｃ１６１はタンパク質の対向面上に存在する。ＴＩＧＡＲ活性部位への近接性を与えられたＣ１１４の断片標識化の特徴づけに重点を置いた。組換え型ＴＩＧＡＲのＣ１１４及びＣ１６１の両方をＩＡ－ローダミンにより標識し、この標識化はＣ１１４Ｓ及びＣ１６１Ｓの単一の突然変異体において部分的に縮小し、ＴＩＧＡＲのＣ１１４Ｓ／Ｃ１１６Ｓの二重突然変異体において完全に遮断されたことを、最初に確認した（図９Ｉ）。また、ＬＣ－ＭＳ分析（表６）により、及び、１６μＭのＩＣ$_{50}$値でＣ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲ突然変異体のＩＡ－ローダミン標識化を断片が遮断したことを示すことにより、ＴＩＧＡＲのＣ１１４を持つヒット断片５の相互作用を検証し（図８Ｋ、Ｌ）；対照的に、対照断片３は、はるかに低い潜在能を示した（図８Ｋ、Ｌ）。５はまた、基質アッセイを使用して、ＷＴ－ＴＩＧＡＲ及びＣ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲの触媒活性を遮断したが、Ｃ１１４Ｓ－ＴＩＧＡＲ又はＣ１１４Ｓ／Ｃ１６１Ｓ－ＴＩＧＡＲは遮断しなかった（図８Ｍ）。対照断片３は、ＴＩＧＡＲ触媒活性に影響を及ぼさなかった（図８Ｌ）。５によるＴＩＧＡＲ基質の代謝回転（ｔｕｒｎｏｖｅｒ）の阻害は、７０％で定常に達し（図９Ｊ）、これは、共有結合性のリガンドがアロステリック機構により作用し、又は完全な阻害をもたらすためにＴＩＧＡＲの活性部位へと完全に伸長しないことを示している。

【０５１８】

癌細胞におけるＩＤＨ１活性を阻害する求電子性リガンド

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ１（ＩＤＨ１）及び２（ＩＤＨ２）は、多くのヒトの癌において突然変異し、イソシトラートを２－ヒドロキシグルタラート（２－ＨＧ）に変換する新形質の触媒活性を持つ変異型酵素を生成する。２－ＨＧの増大は、特にＤＮＡ及びタンパク質をメチル化することにより、腫瘍抑制因子として機能するα－ケトグルタラート依存性のジオキシゲナーゼを阻害する。競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験により、ＩＤＨ１及びＩＤＨ２において保存されたシステインを標的としたリガンドの異なる亜群を同定した（それぞれ、Ｃ２６９及びＣ３０８；表１－３）。このシステインは、ＩＤＨ１の結晶構造においてＮＡＤＰ$^{+}$分子から１３Åである、活性部位に近接した残基であり（図１０Ａ）；Ｃ３０８のグルタチオン化は以前に、ＩＤＨ２活性を遮断することを示したが、我々の知る限りでは、ＩＤＨ酵素の不可逆阻害剤は特徴付けられなかった。

【０５１９】

ＩＤＨ１の野生型（ＷＴ）及びＣ２６９Ｓ突然変異体を組み換えで発現することによるＩＤＨ酵素とのリガンド相互作用の機能的な有意性を、調べた。Ｃ２６９Ｓ－ＩＤＨ１ではなくＷＴ－ＩＤＨ１が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより検出されるようなＩＡ－ローダミンプローブと反応し、断片求電子は、競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験における内因的なＩＤＨ１について観察されるものを映したＳＡＲとの、この反応を遮断した（図１１Ａ及び表１－３）。断片２０は、２．９μＭのＩＣ$_{50}$値でＷＴ－ＩＤＨ１のＩＡ－ローダミン標識化を阻害し（図１１Ｂ及び図１０Ｂ）、ＩＤＨ１のＲ１３２Ｈ発癌性突然変異体と同様の活性を示した（図１０Ｃ及び図２０）。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより、２０（２

５μＭ）がＭＤＡ－ＭＤ－２３１プロテオームにおける内因的なＩＤＨ１のＩＡ－アルキン標識化を完全に遮断し（Ｒ値＝２０；図１０Ｄ）、及びＭＳ分析により、２０がＩＤＨ１のＣ２６９を修飾する（表６）ことも、確認した。断片２は、ＩＤＨ１のＣ２６９に対して非常により少ない活気を示し（IC_{50}＞５０μＭ；図１１Ｂ及び図１０Ｂ）、故に対照のプローブとして選択された。２０は、（イソシトラートの存在下でＮＡＤＰＨへのＮＡＤＰ＋の減少により測定されるように）濃度依存性の方式でＷＴ－ＩＤＨ１の触媒作用を遮断したが、Ｃ２６９Ｓ－ＩＤＨ１突然変異体の活性を阻害しなかったことが分かった（図１１Ｃ）。２０のインサイツでの活性も、Ｒ１３２Ｈ－ＩＤＨ１を安定して過剰発現したヒト癌細胞株の生成により試験した（図１０Ｅ）。Ｒ１３２Ｈ－ＩＤＨ１細胞を２時間、断片２０及び２で処理し、溶解し、２－ＨＧ産生のために実験施設内で（ｅｘ　ｓｉｔｕ）アッセイした。２０（５０μＭ）は、Ｒ１３２Ｈ細胞溶解物により２－ＨＧの産生を略完全に遮断し、一方で２（５０μＭ）は、この活性のわずかな減少を引き起こしただけであった（図１１Ｄ）。平行の競合的なｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験により、断片２ではなく断片２０が、インサイツでのＩＤＨ１のＣ２６９のＩＡ－アルキン標識化を阻害したことを確認した（図１０Ｆ）。

【０５２０】

細胞におけるシステインに反応的な断片の全体的なプロファイリング

ＩＤＨ１リガンド２０の細胞活性により促されて、インサイツでタンパク質性のシステインを修飾する断片求電子の能力を、更に広く評価した。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１及びＲａｍｏｓ細胞を、断片ライブラリーの典型的なメンバーで処理し（合計２３の化合物を試験；各化合物を、インサイツの処理で２時間、２００μＭで試験した）、その後細胞を収集し、溶解し、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより分析した。少量の断片は細胞に対し細胞傷害性であり、更に低い（５０又は１００μＭ）濃度で再試験した。試験した断片は、インビトロでのそれぞれの反応性に通常一致する広範囲のインサイツの反応性を示した（図１１Ｅ及び表１－３）。しかし、一部の断片は細胞において幾らか大きな反応性を示したが、断片１１はインサイツでの活性を著しく欠いていた（図１１Ｅ）。これらの差は、断片求電子の細胞内濃度に対する輸送及び／又は代謝経路の影響を反映している。細胞溶解物において同定される、リガンド結合したシステインの実質的な断片（６４％）も、細胞における同じ求電子性断片に敏感であった（図１１Ｆ）。少量の断片－システインの相互作用も、ｐ５３（ＴＰ５３）のＣ１８２、ＤＮＡ結合ドメイン^{50}の二量体化インターフェースでレドックス調節された残基を含む溶解物ではなく、インサイツで選択的に観察される（図１１Ｇ）。幾つかの例において、これらのリガンド結合したシステインは、断片求電子との相互作用を保つための無傷の細胞環境に必要とする。総合すれば、これらの発見は、システイン残基のリガンド結合可能性が通常、溶解物と細胞において同様であるが、例外的な場合は、インサイツでリガンド発見実験を行う能力を持つ重要性を強調することを、示している。

【０５２１】

プロ－カスパーゼ－８を標的とし且つ外因性の細胞死を遮断する、求電子性リガンド

様々な断片は、インビトロ及びインサイツで行われるｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において、プロテアーゼカスパーゼ－８（ＣＡＳＰ８）の、触媒性のシステイン求核分子Ｃ３６０を標的とした（図１２Ａ及び表１－３）。ＣＡＳＰ８は、アポトーシス、免疫細胞増殖、及び胚発生において重要な役割を果たすが、このプロテアーゼのための選択的で非ペプチド性の細胞活性の阻害剤が不足している。組換え型の活性なＣＡＳＰ８に対する典型的な断片のヒットを、基質、及び、活性に基づくプローブ（Ｒｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」））アッセイを使用してスクリーンし、大半の断片でわずかなものから阻害が無いものまでを確認した（図１２Ｂ）。最初はこの結果に当惑したが、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験におけるＣＡＳＰ８の断片標識化が、このプロテアーゼの活性型ではなく不活性な酵素前駆体（プロ－）との反応を反映するかもしれないことを、仮定した。ウエスタンブロットにより、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞溶解物におけるＣＡＳＰ８の全てではないにしても大半がプロ型で存在

したことを確認した（図１２Ｃ）。次に、プロ－ＣＡＳＰ８の組換え型を、突然変異した切断部位（Ｄ３７４Ａ及びＤ３８４Ａ）で発現し、処理及び活性化を防いだ。プロ－ＣＡＳＰ８の非触媒性システインＣ４０９Ｓも突然変異し、これにより、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によるＩＡ－ローダミンでのＣ３６０の標識化の検出を可能にした（図１３Ａ）。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において検出された様々なヒット断片は、プロ－ＣＡＳＰ８のＩＡ－ローダミン標識化を遮断した（図１２Ｄ）。断片７は、～５μＭのIC_{50}値での最も高い潜在能を表示し（図１３Ａ、Ｂ）、これは、この断片の低い全体的なプロテオーム反応性（３％）と組み合わさると、更なる研究のための適切なツール化合物として指定される。

【０５２２】

断片７（５０μＭ）は、Ｒａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞溶解物の両方で実行されたｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において、ＣＡＳＰ８のＣ３６０のＩＡ－アルキン標識化を完全に遮断した（図１３Ｃ）。次に、７（６１）のクリック可能なアナログを合成し、このプローブ（２５μＭ）は、Ｃ３６０Ｓ－プロ－ＣＡＳＰ８突然変異体ではなくプロ－ＣＡＳＰ８突然変異体を強く標識したことが分かった（図１３Ｄ及び図１２Ｅ）。７（５０μＭ）は、６１によるプロ－ＣＡＳＰ８の標識化を遮断したが、活性型カスパーゼを標的とするために開発されたＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）による活性ＣＡＳＰ８の標識化を阻害しなかった（図１３Ｄ及び図１２Ｆ）。反対に、一般的なカスパーゼ阻害剤であるＡｃ－ＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（２０μＭ）は、活性ＣＡＳＰ８のＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）の標識化を遮断したが、プロ－ＣＡＳＰ８の６１の標識化は阻害しなかった（図１３Ｄ、図１２Ｆ、図２１Ａ）。同様の結果を基質アッセイにおいて得て、そこでは、７ではなくＤＥＶＤ－ＣＨＯ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）がＣＡＳＰ８活性を遮断した（図１３Ｅ）。基質でアッセイされた組換え型の活性なＣＡＳＰ３（図１３Ｅ）、又はＲｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示される「ＤＥＶＤ」）（図１２Ｆ）、或いはｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより測定される細胞溶解物におけるＣＡＳＰ２とＣＡＳＰ７（図１２Ｇ）を含む、他のカスパーゼとの７の交差反応性は観察されなかった。最終的に、７が複雑な生物系において活性なＣＡＳＰ８の上でプロ－ＣＡＳＰ８と優先的に反応することを更に検証するために、これらのタンパク質の組換え型をＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞溶解物にドープし、その後、７（３０μＭ、１時間）又はＤＭＳＯでの処理、及びｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによる分析を行った。７は、プロ－ＣＡＳＰ８（Ｒ＝１０）のためのＣ３６０のＩＡ－アルキン標識化のほぼ完全な遮断をもたらしたが、活性ＣＡＳＰ８（Ｒ＝１．９）のＣ３６０とのＩＡ－アルキン反応には効果がほとんどなかった（図１３Ｆ）。

【０５２３】

１０又は１００μＭの６１でのＪｕｒｋａｔ細胞溶解物の処理、その後のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰによる組み合わせたサンプルの分析により、６１によるＣＡＳＰ８のＣ３６０の直接的な標識化を確認した（図１２Ｈ）。この分析においてＣ３６０について観察された低いＲ値（Ｒ＝２）は、ＣＡＳＰ８のＣ３６０のＩＡ－ローダミン標識化を阻害するために親断片７により表示される低いμＭのIC_{50}値と一貫している、細胞溶解物において１０μＭでの６１によるこのシステインのほぼ完全な標識化を示した（図１３Ｂ）。細胞のアポトーシスアッセイにおけるプロ－ＣＡＳＰ８阻害の効果を次に評価した。Ｃ３６０はＣＡＳＰ８の触媒性の求核分子であるため、この残基の突然変異は、細胞における７の薬理学的効果を評価するために制御タンパク質を作り出すことができなかった。代わりに、構造上関連する不活性のプローブを、この目的のために開発した。７のアニリン環上に置かれるかさ高い置換基が、ＩＡ－ローダミンによるプロ－ＣＡＳＰ８標識化を阻害しなかった６２などの化合物を与えたことが分かった（図１３Ｂ、Ｇ）。６２はまた、基質（図１３Ｅ）及び活性プローブ（図１２Ｆ）のアッセイを使用して活性ＣＡＳＰ３又はＣＡＳＰ８を阻害せず、且つ、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより判定されるようにＪｕｒｋａ

ｔ溶解物において内因性のＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ２、又はＣＡＳＰ７に対して不活性であったことを、確認した（図１２Ｇ）。これらのデータに基づいて、６２を、７によるプロ－ＣＡＳＰ８の阻害を研究するために適切な不活性の対照プローブとして設計した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を、ＦＡＳＬ又はスタウロスポリン（ＳＴＳ）の追加前に７又は６２（３０μＭ、３０分）で処理し、外因性且つ内因性のアポトーシスをそれぞれ誘導した。６２ではなく７が、ＦＡＳＬで誘導されたアポトーシスを完全に遮断し（図１３Ｈおよび図２１Ｂ－Ｃ）、同様に、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ８、及びアポトーシスマーカーＰＡＲＰのタンパク質分解性の処理を遮断した（図１３Ｉ）。対照的に、７は、ＳＴＳで誘導された固有のアポトーシス（図１３Ｈ）又はＰＡＲＰ及びＣＡＳＰ３の切断を遮断しなかったが、化合物はこれら細胞におけるＣＡＳＰ８の切断を実質的に阻害した（図１３Ｉ）。選択的でないカスパーゼ阻害剤ＶＡＤ－ＦＭＫは、ＦＡＳＬ及びＳＴＳで誘導されたアポトーシス、並びに関連するタンパク質分解性の処理事象の両方を妨げた（図１３Ｈ、Ｉ）。化学的なプロテオミクス実験により、７が、ＣＡＳＰ８に加えて、Ｊｕｒｋａｔ細胞の関連するイニシエーターであるカスパーゼＣＡＳＰ１０（ＣＡＳＰ２、３、６、及び９を含む他のカスパーゼではない）を完全に阻害したことを明らかにした（図１４Ａ及び図２２Ａ）。Ｒｈｏ－ＤＥＶＤ－ＡＯＭＫプローブ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５７として開示された「ＤＥＶＤ」）（図２１Ａ）又は基質アッセイ（図２２Ｅ）での標識化により測定されるように、７は、４．５μＭの明白なＩＣ$_{50}$値で６１によるプロ－ＣＡＳＰ１０の標識化を遮断したが（図２２Ｂ－Ｄ）、活性ＣＡＳＰ１０を阻害しなかったことを確認した。そのため、幾つかの例において、ＦＡＳＬ及びＳＴＳの両方で処理した細胞におけるＣＡＳＰ８処理を遮断する７は、ＣＡＳＰ８活性化が外因性又は内因性のアポトーシスにおける自己処理を介して主に生じるモデルを支持しているが、プログラム細胞死の以前のタイプのみを必要としている。

【０５２４】

幾つかの例において、外因性のアポトーシス及び他の細胞プロセスにおけるＣＡＳＰ８及びＣＡＳＰ１０のそれぞれの機能は、これらの酵素のための選択的で非ペプチド性の、細胞活性の阻害剤の欠如、及び、ＣＡＳＰ１０（げっ歯類において発現されない）のための動物モデルの欠如が原因で、大部分で理解が乏しいままである。場合によっては、７の潜在能及び選択性を、この問題を扱うために改善した。４－ピペリジノ部分の３－ピペリジノ基への変換、及び７のベンゾイル環へのｐ－モルホリノ置換基の追加は、キラルクロマトグラフィーにより２つの精製されたエナンチオマー、６３－Ｒ（図４Ｃ）及び６３－Ｓへと分離された、化合物６３をもたらし、その前者は、ＣＡＳＰ８に対して実質的に改善された活性（０．７μＭの明白なＩＣ$_{50}$値（９５％のＣＩ、０．５－０．８）；図２２Ｆ－Ｈ）、及びＣＡＳＰ１０とのごくわずかな交差反応性（ＩＣ$_{50}$値＞１００μＭ；図２２Ｃ、Ｄ、Ｆ）を示した。６３－Ｓは、ＣＡＳＰ８（１５μＭの明白なＩＣ$_{50}$値；図２２Ｇ、Ｈ）に対する活性が非常により少なく、また、ＣＡＳＰ１０に対して不活性であった（図１４Ａ）。二重のＣＡＳＰ８／１０（７）及びＣＡＳＰ８に選択的（６３－Ｒ）なリガンドを手に取り、次にこれらプロテアーゼの生物学的機能を調べ始めた。

【０５２５】

ヒトＴ細胞のカスパーゼリガンドの効果は評価し、そこでは、ＣＡＳＰ８とＣＡＳＰ１０の両方が、共通して研究された不死のヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞の中で高度に発現される（図２２Ｉ）。６３－Ｒは、Ｊｕｒｋａｔ細胞においてＦａｓＬで誘導されたアポトーシスを完全に遮断し、７（図１４Ｂ及び図２２Ｊ）又は６３－Ｓ（図２２Ｋ）よりも大きな潜在能で遮断を行ったことが分かった。同様の結果を、ＣＡＳＰ１０２６ではなく、ＣＡＳＰ８を発現するＨｅＬａ細胞において得た（図２２Ｌ）。これらの細胞株の結果とは対照的に、初代ヒトＴ細胞のＦａｓＬで誘導されたアポトーシスは、全ての試験された濃度で６３－Ｒに対する実質的な抵抗を示し、その代りに、二重のＣＡＳＰ８／１０リガンド７により完全に阻害された（図１４Ｂ）。プローブ６１での化学プロテオミクスにより、初代ヒトＴ細胞及びＪｕｒｋａｔ細胞において、７はＣＡＳＰ８とＣＡＳＰ１０の両方を遮断し、一方で６３－ＲはＣＡＳＰ８を阻害したが、ＣＡＳＰ１０は阻害し

なかったことを確認した（図１４Ａ）。これら細胞死の結果と一貫して、６３－Ｒではなく７は、初代ヒトＴ細胞のＣＡＳＰ３及びＣＡＳＰ１０のタンパク質分解性の処理を妨げた（図２２Ｍ）。幾つかの例において、ＣＡＳＰ８及びイニシエーターカスパーゼ基質ＲＩＰキナーゼの両方の処理も、７対６３－Ｒにより有線的に阻害され（図２２Ｍ）、このことは、生化学試験により示唆されるように、ＣＡＳＰ１０がＴ細胞におけるこれらタンパク質分解性の事象にも寄与することを示している。

【０５２６】

実施例２

フマル酸ジメチル（ＤＭＦ）は、多発性硬化症と乾癬を含む自己免疫性疾病を処置するために使用される薬物である。幾つかの例において、ＤＭＦの作用機序は不明瞭であるが、タンパク質の共有結合性修飾に関与し、及び／又はフマル酸モノメチル（ＭＭＦ）に変換されるプロドラッグとして機能すると提唱されている。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ手法を使用して、ＤＭＦの作用機序を調べる。

【０５２７】

化学試薬

アッセイを以下の試薬で行った：フマル酸ジメチル（ＤＭＦ；　２４２９２６；　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、フマル酸モノメチル（ＭＭＦ；　６５１４１９；　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、コハク酸ジメチル（ＤＭＳ；　Ｗ２３９６０７；　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、及びブチオニンスルホキシミン（ＢＳＯ；　１４４８４；　Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）。

【０５２８】

初代ヒトＴ細胞の単離

ヒトボランティアのサンプルを使用する全ての研究は、ＴＳＲＩ治験審査委員会により承認されたプロトコルに従う。健康なドナー（３０－４９歳の女性）から血液を、インフォームドコンセントの後で得た。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、製造業者の指示に従ってＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７の勾配（１０７７１；Ｓｉｇｍａ）上で精製した。簡単に、血液（２０×２５ｍＬの血液アリコート）をＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７（１２．５ｍＬ）の上に重ね、その後、サンプルを遠心分離（２０００ｒｐｍ、２０分、２０℃、ブレーキ無し）により分画した。ＰＢＭＣをＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ－プラズマ界面から収集し、ＰＢＳで２回洗浄した。その後、Ｔ細胞を、製造業者の指示に従いＥａｓｙＳｅｐ（商標）のヒトＴ細胞単離キット（１７９５１；ＳＴＥＭＣＥＬＬ）を使用して単離した。

【０５２９】

マウス

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ及びＮｒｆ２－／－マウス（Ｓｔｏｃｋ　Ｎｏ：０１７００９；Ｎｆｅ２ｌ２^{ｔｍｌＹｗｋ}；Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｓ）を繁殖させ、Ｔｈｅ　Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅの閉鎖した繁殖用施設の中で維持し、実験での使用時には６－８週齢であった。全てのマウスを、Ｔｈｅ　Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＩｎｓｔｉｔｕｔｅのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅのガイドラインに従って使用した。

【０５３０】

ＰＫＣθ研究のために、Ｃ５７ＢＬ／６マウス及びＰｒｋｃｑ$^{－／－}$マウスを、特定の病原体の無い条件下で収容し、Ａｌｌｅｒｇｙ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ＣｏｍｍｉｔｔｅｅのＬａ　Ｊｏｌｌａ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅにより承認されたプロトコルに従って使用した。

【０５３１】

初代マウスＴ細胞の単離

雌のマウスから脾臓を採取し、コラゲナーゼを潅流させ、３０分間、５％のCO_2により３７℃でインキュベートした。この後、脾臓を均質化した。１００μｍのセルストレーナーに通して細胞を収集し、ＲＰＭＩで洗浄した。製造業者の指示に従い、ＥａｓｙＳｅ

ｐ（商標）のマウスＴ細胞単離キット（１９８５１；ＳＴＥＭＣＥＬＬ）を使用して、Ｔ細胞を脾細胞から単離した。

【０５３２】

ＰＫＣθ研究のために、ＣＤ４＋Ｔ細胞を、抗マウスＣＤ４磁気微粒子（Ｌ３Ｔ４；ＢＤ　ＩＭａｇ）により単離し、１０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）の熱失活したＦＢＳ、２ｍＭのグルタミン、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１ｍＭのＭＥＭ非必須アミノ酸、各々１００Ｕ／ｍＬのペニシリンＧ及びストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び組換え型ＩＬ－２（１００Ｕ／ｍＬ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で補足されたＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ）において培養した。

【０５３３】

Ｔ細胞の刺激

９６－ウェルのプレートを、４℃で一晩、ＰＢＳ（１００μＬ／ウェル）において抗ＣＤ３（１：２００；ＢｉｏＸｃｅｌｌ）及び抗ＣＤ２８（１：５００；３０２９３３；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で覆った。その後、プレートをＰＢＳで２回洗浄し、各ウェルに、１０％のＦＢＳ、グルタミン、及びＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐで補足された１００μＬのＲＰＭＩにおいて５００，０００の初代Ｔ細胞を加えた。その後、示された濃度（２００μＬの最終のウェルの量）で化合物を含有する１００μＬの培地で細胞を処理した。細胞を、示された時間にわたり５％のＣＯ２インキュベーター中で３７℃で放置し、遠心分離（５００ｇ、８分、４℃）により収集して、ＰＢＳで洗浄した。

【０５３４】

フローサイトメトリーによる細胞の分析及び選別

細胞を丸底の９６－ウェルのプレート（０７２００９５；Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に移し、遠心分離（５００ｇ、３分、４℃）により収集し、ＰＢＳで洗浄して、製造業者の指示に従いＬＩＶＥ／ＤＥＡＤの固定可能な細胞染色（Ｌ２３１０５；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）で染色した。簡単に、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色の１つのバイアルを５０μＬのＤＭＳＯの中で再懸濁され、２０ｍＬのＰＢＳを加えた。９６－ウェルのプレートの各ウェルに２００μＬの染色物を加え、細胞を暗所で３０分間、氷の上でインキュベートした。この後、細胞をペレット状にし、ＰＢＳで１回洗浄し、その後、細胞表面抗原のために染色した。

【０５３５】

細胞表面抗原のフローサイトメトリー分析を、以下の抗体で行った：ＰａｃｉｆｉｃＢｌｕｅで結合した抗ＣＤ８（１：２５の希釈；クローンＲＰＡ－Ｔ８；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＡＰＣで結合した抗ＣＤ４（１：２５の希釈；クローンＲＰＡ－Ｔ４；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、フィコエリスリンで結合した抗ＣＤ２５（１：２５の希釈；クローンＢＣ９６；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ又はＰＣ６１；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（ＰＫＣθ　ｓｔｕｄｉｅｓ））、ＦＩＴＣで結合した抗ＣＤ６９（１：２５の希釈；クローンＦＮ５０；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。全ての抗体をＰＢＳ中の１％のＦＢＳにおいて希釈し、５０μＬの染色液を各ウェルに加えた。細胞を暗所の中、氷の上で１５分間染色し、その後、細胞を遠心分離（５００ｇ、３分、４℃）により収集し、ＰＢＳ中の１％のＦＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中の２００μＬ／ウェルの４％のＰＦＡにおいて再懸濁した。フローサイトメトリーでの獲得を、ＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａ（商標）により駆動するＢＤ（商標）ＬＳＲ　ＩＩフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ，　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）で行った。その後、データをＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅｓｔａｒ　Ｉｎｃ．）で分析した。データは、１つの群につき４－５の実験のための平均±ＳＥを表わす。

【０５３６】

酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）による分泌されたサイトカインの定量化

上述のようにＴ細胞を収集して刺激した。示された時点で、細胞培養の上清を収集し、ＩＬ－２レベルを、製造業者の指示（ヒトＩＬ－２　ＤｕｏＳｅｔ　ＥＬＩＳＡ；ＤＹ２０２；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）に従い透明のマイクロプレート（９９１４２７；Ｒ＆Ｄ

Ｓｙｓｔｅｍｓ）において測定した。プレートを、４５０ｎｍに設定されたＧｅｍｉｎｉ ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ ２５０マイクロプレートリーダにおいて読み出した。データは、１つの群につき４つの実験のための平均±ＳＥを表わす。

【０５３７】

ＰＫＣθ研究のために、形質導入されたＰｒｋｃｑ$^{-/-}$ＣＤ４＋Ｔ細胞（１×１０^{6}）のアリコートを、抗ＣＤ３のみ、又は抗ＣＤ２８と抗ＣＤ３で４８時間刺激し、培養液の上清におけるＩＬ－２の濃度を、製造業者の指示（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）に従い酵素結合免疫吸着測定法により測定する。簡単に、９６－ウェルのプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｃｏｓｔａｒ）を４℃で一晩、ＩＬ－２に対しｍＡｂで覆った。その後、培養細胞からのＩＬ－２基準及び上清を三通り、プレートに加えて、その後に室温で２時間インキュベーションを行った。ＩＬ－２に対するビオチン化されたポリクローナル抗体をプレートに加え、その後、室温で１時間のインキュベーションを行い、次いでＡｖｉｄｉｎ－ＨＲＰを加え、そして室温で３０分間のインキュベーションを行った。その後、結合されたアビジンの量を、２ＮのH_2SO_4により酸性化されたＴＭＢペルオキシダーゼで評価した。その後、４５０ｎｍでの各ウェルの吸収度を、分光測光法プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ）により測定した。

【０５３８】

細胞グルタチオン（ＧＳＨ）レベルの定量化

初代ヒトＴ細胞（２５０万個の細胞／ｍＬ、１つの条件につき２０ｍＬ）を、示されるように処理し、遠心分離（５００ｇ、８分、４℃）により収集し、ＰＢＳで２回洗浄した。細胞ペレットに、７５μＬの溶解緩衝液を加えた。ボルテックス後、サンプルを氷の上で１５分間インキュベートし、次いで遠心分離（１６，０００ｇ、１０分、４℃）により収集した。タンパク質濃度を少なくとも５ｍｇ／ｍＬに調整し、製造業者の指示（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ， ＣＳ１０２０）に従いアッセイを行った。データは、２つの生物学的な複製のための平均±ＳＥを表わす。

【０５３９】

タンパク質標識化及びクリックケミストリー

細胞を超音波処理により溶解し、２ｍｇのタンパク質／ｍＬの濃度に希釈した。タンパク質濃度を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＤＣ（商標）タンパク質アッセイ試薬Ａ及びＢ（５０００１１３、５０００１１４；Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で測定した。５００μＬのプロテオームサンプルを、１０ｍＭのＤＭＳＯ保存溶液の１０μＬを使用して１００μＭのＩＡ－アルキンのプローブにより処理した。標識化反応物を室温で１時間インキュベートし、その後、サンプルを、銅で触媒されたアジド－アルキンの環化付加（ＣｕＡＣＣ又は「クリックケミストリー」）により、同位体的に標識されたＴＥＶで開裂可能なタグ（ＴＥＶタグ）に結合させた。６０μＬの重クリックケミストリー反応混合物を、ＤＭＳＯで処置し対照サンプルに加え、６０μＬの軽反応混合物を化合物で処置したサンプルに加えた。クリック反応混合物は、ＴＥＶタグ（５ｍＭの保存溶液の１０μＬ、軽（断片で処置）又は重（ＤＭＳＯで処置））、$CuSO_4$（水中の５０ｍＭの保存溶液の１０μＬ）、及びＴＢＴＡ（４：１のｔＢｕＯＨ：ＤＭＳＯにおける１．７ｍＭの保存溶液の３０μＬ）を含んでいた。これに、ＴＣＥＰ（５０ｍＭの保存溶液の１０μＬ）を加えた。反応を室温で１時間行った。

【０５４０】

その後、軽及び重標識されたサンプルを遠心分離し（１６，０００ｇ、５分、４℃）、沈殿したタンパク質を収集した。結果として生じるペレットを、超音波処理により５００μＬの冷たいメタノール中で再懸濁し、重及び軽サンプルを対で組み合わせた。その後、組み合わせたペレットを、冷たいＭｅＯＨで洗浄し、その後、超音波処理により１．２％のＳＤＳを含有するＰＢＳノ中でペレットを可溶化した。サンプルを９０℃で５分間加熱し、公表されたｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰプロトコルに従って、プローブで標識されたタンパク質のストレプトアビジン富化、連続するオンビーズ・トリプシン及びＴＥＶの消化、並びに液体クロマトグラフィータンデム質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）にさらした。

【０５４１】
ペプチド及びタンパク質の同定
ＲＡＷ Ｘｔｒａｃｔｏｒ（バージョン１．９．９．２）を使用して、未加工のファイルからＭＳ２スペクトルデータを抽出した。ＰｒｏＬｕＣＩＤアルゴリズムを使用して、ＭＳ２データを、Ｈｕｍａｎ ＵｎｉＰｒｏｔのデータベース（ｒｅｌｅａｓｅ－２０１２＿１１）の逆連鎖の非冗長的な変異体に対して探索した。システイン残基を、カルボキサミドメチル化のための静的な修飾により（＋５７．０２１４６）、及び、軽又は重のＴＥＶタグ（それぞれ＋４６４．２８５９５又は＋４７０．２９９７６）の何れかのための最大１つの特異な修飾により探索した。ペプチドは、少なくとも１つのトリプシン末端を有し、且つＴＥＶ修飾を含むことを要求される。ＰｒｏＬｕＣＩＤデータをＤＴＡＳｅｌｅｃｔ（バージョン２．０）に通して濾過し、１％未満のペプチド無病誤診率を達成した。

【０５４２】
Ｒ値の算出及び処理
重／軽の比率の定量化（ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰの比率、Ｒ値）の定量化を、デフォルトパラメータ（１つのピークにつき３ＭＳ１’ｓ及び信号対ノイズの閾値２．５）を使用して、インハウスのＣＩＭＡＧＥソフトウェアにより行った。求電子化合物の部位特異的な結合を、ＩＡ－アルキンプローブの標識化の遮断により評価した。ＤＭＳＯで処理したプロテオーム（重ＴＥＶタグ）と比べて、化合物で処理したプロテオーム（軽ＴＥＶタグ）からのＭＳ１ピーク面積において≧９５％の減少を示したペプチドについて、２０の最大の比率を割り当てた。同じ標識されたシステインと重複するペプチド（例えば、標識されたシステインの周囲の同じ局所的配列であるが、異なる荷電状態、ＭｕｄＰＩＴセグメントの数、又はトリプシンの末端）を１つにまとめ、各群からの中央の比率を、その実行のためにペプチドのＲ値として記録した。

【０５４３】
システイン保存の分析
ＤＭＦ感受性のシステインを含有するヒトタンパク質それぞれについて、マウスの相同体を同定し、ヒト及びマウスの配列をＵｎｉＰｒｏｔの上でＡｌｉｇｎツールを使用して整列させた。

【０５４４】
ＮＦ－ｋＢ転位の免疫蛍光分析
上述のように初代ヒトＴ細胞を収集して刺激し（５００，０００個の細胞／ウェル）、それに付随して６０分間のＤＭＳＯでの処理を行った。細胞をペレット状にし（５００ｇ、３分、４℃）、次に各ウェルを５０μＬのＰＢＳにおいて再懸濁し、ポリ－Ｄ－リジンでコーティングしたカバーガラス（１２ｍｍ；３５４０８７；Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）ＢｉｏＣｏａｔ（商標））に加えた。細胞を４℃で３０－６０分間、カバーガラスに付けた。カバーガラスを６ウェルのプレートに移し、室温で１０分間、４％のＰＦＡ（１５７－４－１００；Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）で固定した。ＰＢＳで３回洗浄後、細胞を室温で１０分間、ＰＢＳ中で０．１％のＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で透過処理した。細胞をＰＢＳで３回洗浄し、次いでＰａｒａｆｉｌｍ上で細胞を上向きに置いた。各カバーグラスに、１５０μＬの遮断緩衝液（ＰＢＳ中で２％のＢＳＡ）を加え、スライドを室温で３０分間遮断した。

【０５４５】
遮断緩衝液を吸引し、カバーガラスを下向きにして４０μＬの抗体緩衝液（抗ヒトｐ６５；ｐ６５Ａｂ；ＦｉｖｅＰｈｏｔｏｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ；遮断緩衝液において１：５００の希釈物）の中に置き、湿ったチャンバの中で４℃で一晩かけて染色した。カバーガラスをＰＢＳで３回洗浄し、次に室温で２時間、１５０μＬの二次抗体（抗ウサギのＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８；Ａ２１４４１；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ＰＢＳにおいて１：２００の希釈物）でインキュベートした。ＰＢＳで３回の洗浄後、１５０μＬのＨｏｅｃｈｓｔ対比染色を加え（ＰＢＳにおいて５μｇ／ｍＬ）、カバ

ーガラスを室温で３０－６０分間放置した。細胞を再びＰＢＳで３回洗浄し、その後、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５５５ Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎ ｒｅｄ（８９５３Ｓ；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ；ＰＢＳにおいて１：２０の希釈物）で染色する。カバーガラスをＰＢＳで最後に３回洗浄し、その後、１０μＬのＰｒｏｌｏｎｇ（登録商標）Ｇｏｌｄ Ａｎｔｉｆａｄｅ Ｍｏｕｎｔａｎｔ（Ｐ３６９３４、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）で染みをつけたＳｕｐｅｒＦｒｏｓｔ Ｐｌｕｓのスライド（１２－５５０－１５、Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ）に移した。各カバーガラスの周囲を、透明なマニキュア液（７２１８０；Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）で密閉した。

【０５４６】

６３倍の対物レンズ（Ｏｂｊｅｃｔｉｖｅ）（０．３μｍの画像の刻み幅）と自動ステッチングモジュール（ａｕｔｏｍａｔｅｄ ｓｔｉｔｃｈｉｎｇ ｍｏｄｕｌｅ）を統合したＺｅｉｓｓ７８０レーザー走査共焦点顕微鏡を使用して画像を獲得し（１０％の重複）、３次元のマルチパネルの大規模な画像の複合体を作成する。複合画像を、ｚｅｎソフトウェアを使用して自動に統合された、少なくとも９の個別画像パネルのｚ－シリーズとして収集した。大規模な画像の複合体を、ｚｅｎソフトウェアにおいて最大の画像投影へと投影し、その後、Ｚｅｎ（Ｚｅｉｓｓ Ｉｎｃ）及びＩｍａｇｅ Ｐｒｏ Ｐｒｅｍｉｅｒ（Ｍｅｄｉａ Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ）を使用して分析した。Ｍａｎｄｅｒの相関係数（ＭＣＣ）、具体的に、蛍光標識の様々な組み合わせの間のＭ１及びＭ２（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｐｈａｌｌｏｉｄｉｎ ｖｓ ＮＦｋＢ－Ｐ６５及びＨｏｅｃｈｓｔ ｖｓ ＮＦｋＢ－ｐ６５）を、１つの細胞当たりＺＥＮ（Ｚｅｉｓｓ ｉｎｃ）において計算し、パーセントとして表示する。対象のモジュールの領域を使用して各細胞の概略を示し、その後ソフトウェアにより、２つのフルオロフォア間のＭ１及びＭ２の相関係数を計算し、結果を表にした。蛍光シグナルのダイナミックレンジ、及び実信号の閾値カットオフを、複数のバックグラウンド及び二次制御により定めた。Ｉｍａｇｅ Ｐｒｏ Ｐｒｅｍｉｅｒ（ＩＰＰ）（Ｍｅｄｉａ Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ）を使用して相関係数を比較し、そこでは画像を未加工の較正されたｃｚｉファイルとして取り込み、ＩＰＰにおいて同様のモジュールを使用して分析した。同様の結果を、両方のプラットフォームにより得た（図示せず）。データは、２－３の生物学的な複製のための平均±ＳＥを表わす。

【０５４７】

サブクローン化及び突然変異生成

ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ部位特異的突然変異誘発を、完全長のヒトＰＫＣθ（残基１－７０７）を含有するｐＥＦ４ Ｈｉｓ Ａプラスミド上で行った。ＢａｍＨＩ及びＸｈｏＩを使用してＰＫＣθ挿入物を切除し、次にｐＭＩＧベクターへとライゲートした。

【０５４８】

ＰＫＣθのレトロウイルスの導入及び刺激

白金Ｅパッケージング細胞を、１０％のＦＢＳを加えた２ｍＬのＲＰＭＩ－１６４０培地において、６ウェルのプレートに蒔いた。２４時間後、細胞を、ＴｒａｎｓＩＴ－ＬＴ１トランスフェクション試薬（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）により、空のｐＭＩＧベクター又は適切なＰＫＣθ発現ベクターＤＮＡ（３μｇ）をトランスフェクトした。一晩のインキュベーション後、培地を交換し、培養を更に２４時間維持した。その後、レトロウイルスの上清を収集して濾過し、８μｇ／ｍＬのポリブレンで補足し、これを使用して、ＣＤ３（８μｇ／ｍＬ）及びＣＤ２８（８μｇ／ｍＬ）へとプレート結合されたモノクローナル抗体で２４時間、予め活性化されたＣＤ４＋Ｔ細胞を感染させた。２，０００ｒ．ｐ．ｍ．で１．５時間のプレートの遠心分離後、細胞の上清を、１０％のＦＢＳ及び組換え型ＩＬ－２（１００Ｕ／ｍＬ）で補足された新鮮なＲＰＭＩ－１６４０と取り替えた。細胞を３７℃で更に２４時間インキュベートした。３日目に、細胞を洗浄し、新しいプレートに移して、ｍＡｂによるＣＤ３のみへの再刺激、加えてｍＡｂによるＣＤ２８への再刺激の前に更に２日間の刺激を行うことなく、１０％のＦＢＳ及び組換え型ＩＬ－２（１０のＵ／ｍＬ）を含有するＲＰＭＩ－１６４０培地において培養した。

【０５４９】

ＰＫＣθの免疫沈降及びイムノブロット解析
プロテアーゼ阻害剤（１０μｇ／ｍＬのアプロチニン、１０μｇ／ｍＬのロイペプチン、及び１ｍＭのＰＭＳＦ）、並びにホスファターゼ阻害剤（５ｍＭのピロリン酸ナトリウム及び１ｍＭのＮａ３ＶＯ４）で補足された、１％（ｗｔ／ｖｏｌ）のジギトニン（Ｄ１４１、Ｓｉｇｍａ）の溶解緩衝液（２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭのＥＤＴＡ）において、細胞を溶解した。上清を１μｇの抗ＣＤ２８　ｍＡｂで２時間インキュベートし、タンパク質を、Ｇタンパク質セファロースビーズ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）により４℃で一晩、免疫沈降させた。免疫沈降させたタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分解し、ＰＶＤＦ膜上に移し、一次抗体により４℃で一晩探索し、その後、ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）で結合した二次抗体により室温で１時間のインキュベーションを行った。化学発光（ＥＣＬ；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりシグナルを視覚化し、Ｘ線フィルムに晒した。デンシトメトリー分析をＩｍａｇｅＪソフトウェアにより行った。ＣＤ２８（Ｃ－２０）及びＰＫＣθ（Ｃ－１９）に対するイムノブロッティング抗体を、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから得た。

【０５５０】
ＭＭＦではなくＤＭＦがＴ細胞活性化を阻害する。
多発性硬化症は、顕著なＴ細胞成分を伴う自己免疫疾患である；そのため、ＤＭＦが場合によっては初代Ｔ細胞活性化に影響を及ぼすことが論じられた。これに一貫して、以前の報告は、ＤＭＦがマウス脾細胞からのサイトカイン放出を阻害し、且つＩＬ－１０を産生するＩＩ型樹状細胞の誘導を介してＴｈ２表現型を促進することを示している。ＤＭＦ及びＭＭＦ（図２３Ａ）の効果を、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８の抗体により活性化された初代ヒトＴ細胞からのサイトカイン放出に対して試験した。ＩＬ－２の分泌は、ＭＭＦではなくＤＭＦにより強く阻害された（図２３Ｂ）。ＭＭＦではなくＤＭＦ、又は非求電子性のアナログであるコハク酸ジメチル（ＤＭＳ、図２３Ａ）も、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８で刺激されたＴ細胞において、早期活性化マーカーＣＤ２５（図２３Ｃ、Ｄ）及びＣＤ６９（図２３Ｅ）の発現を遮断した。ＤＭＦによるＴ細胞活性化の遮断は濃度依存性であり、１０、２５、及び５０μＭの薬物がそれぞれ、周縁の／ごくわずかな、部分的な、及びほぼ完全な阻害をもたらした（図２３Ｂ、Ｄ、Ｅ）。幾つかの例において、サイトカイン放出及び活性化マーカーに対するＤＭＦの効果は、Ｔ細胞の生存度を損なわなかった薬物の濃度で生じた（図２４）。同様の結果をＣ５７ＢＬ／６マウスの初代脾臓Ｔ細胞から得て、その活性化はまた、ＭＭＦまたはＤＭＳではなくＤＭＦにより抑えられた（図２５）。注目すべきことに、薬物が抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８での刺激の２時間後に加えられた場合、ＤＭＦの阻害効果は低減し、及び、薬物が刺激の６時間後に加えられた場合、ＤＭＦの阻害効果は完全に取り除かれ（図２３Ｆ）、このことは、Ｔ細胞活性化に対するＤＭＦの効果がＮｒｆ２及びＧＳＨとは独立しているＴ細胞活性化経路における初期の事象を阻害することを示唆している。

【０５５１】
ＤＭＦは、Ｎｒｆ２－Ｋｅａｐ１経路の活性化を介して神経保護効果をもたらすと考えられるが、この経路がＤＭＦの免疫修飾物質の効果に寄与するかどうかは不明瞭である。近年の研究は、ＤＭＦが初代マウス脾細胞からの炎症促進性サイトカインの放出を阻害し、活この効果が、野生型及びＮｒｆ２（－／－）の脾細胞において比較可能であったことを示した（Ｇｉｌｌａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，“ＤＭＦ，ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｏｔｈｅｒ　ｆｕｍａｒａｔｅｓ，ｉｎｈｉｂｉｔｓ　ＮＦ－ｋａｐｐａＢ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｉｎ　ａｎ　Ｎｒｆ２－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｍａｎｎｅｒ，”　Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．　２８３，　７４－８５　（２０１５））。これに一貫して、Ｎｒｆ２（＋／＋）及び（－／－）のＴ細胞の活性化は同様に、ＤＭＦによる阻害に敏感であったことが分かった（図２６Ａ）。幾つかの例において、ＤＭＦはまた、グルタチオン（ＧＳＨ）を枯渇させることによりＴ細胞活性化を損ない、実際に、ＤＭＦで処理した初代ヒトＴ細胞は、細胞のＧＳＨ含有量の著しい減少を示した（図２６Ｂ）

。しかし、ＧＳＨの著しい減少はまた、Ｔ細胞活性化に対する効果を持たないＧＳＨ合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン（ＢＳＯ）により観察された（図２６Ｃ、Ｄ）。場合によっては、これらのデータは、ＤＭＦによるＴ細胞活性化の遮断がＮｒｆ２活性化又はＧＳＨ枯渇以外のプロセスに関与することを示している。

【０５５２】

Ｔ細胞におけるＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基の化学的なプロテオミクスの発見

非求電子性のアナログであるＭＭＦ及びＤＭＳではなく、ＤＭＦによるＴ細胞活性化の阻害は、Ｔ細胞の機能に重要な１以上のタンパク質とので共有結合性の反応に関与する機構を指し示した。そのため、初代ヒト及びマウスＴ細胞におけるＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基の全体的な一覧（ｉｎｖｅｎｔｏｒｙ）を、定量的で化学的なプロテオミクスのプラットフォーム、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰを使用して調べた。この方法において、ＤＭＦを、通常の求電子性プローブであるヨードアセトアミド－アルキン（ＩＡ－アルキン）とのタンパク質性Ｃｙｓ残基の反応を遮断する能力について評価する。同位体的に分化されたアジド－ビオチンのタグ（ＴＥＶプロテアーゼ開裂可能なリンカーを含む）を使用して、Ｃｙｓ残基を同定して、ＤＭＦ対ＤＭＳＯ対照で処理された細胞におけるＩＡ－反応性のために比較的定量化する。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰプラットフォームの主な利点は、以下の通りである：１）競合する求電子は標的の同定のために自身を化学的に改質する必要は無く、ＤＭＦのような非常に小さな化合物を研究する時に特に有益となる；及び２）同位体的標識化はサンプル処理において遅く生じ、代謝標識化に容易に従わない初代細胞及び組織の定量分析を容易にする。

【０５５３】

ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ方法を、ＤＭＳＯ又はＤＭＦ（５０μＭ、４時間）で処理された初代ヒトＴ細胞上で実行した。独立した５つの複製を実行し、固有の定量化されたペプチド及びタンパク質の総数は、第４及び第５の複製により定常に達し始め（図２８）、このことは、利用される条件下でヒトＴ細胞におけるＩＡに反応的なＣｙｓ残基の最大のプロテオミクスの適用範囲に近づいたことを示している。２４００を超える定量化されたＣｙｓ残基のうち、ごく一部（～４０）が、ＤＭＦで処理したＴ細胞におけるＩＡ－アルキン標識化において実質的な減少（＞４倍；ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ比率（Ｒ値）＞４）を示した（図２７Ａ及び表７－９）。同様のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ分析は、～４０のＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基は何れもＭＭＦ（５０μＭ、４時間）又はＢＳＯ（２．５ｍＭ、４時間）の処理により改質されず、このことは通常、Ｔ細胞プロテオームにわたるごくわずかなＣｙｓ残基の反応に影響を及ぼしたことを明らかにした（それぞれ図２７Ａ、Ｂ、及び図２９）。より低濃度のＤＭＦ（１０及び２５μＭ、４時間）での、又はより短期間（５０μＭのＤＭＦ、１又は２時間）にわたり処理されたヒトＴ細胞で実行されるｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験により明らかとなるように、ＤＭＦにより標的とされたＣｙｓ残基は、ＤＭＦの感度における濃度（図２７Ｃ及び表８－９）及び時間（図２７Ｄ）に依存した増大を示した。注目すべきことに、ごくわずかなＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基が、１０μＭのＤＭＦで処理したＴ細胞において検出され、薬物の濃度はまた、Ｔ細胞活性化への影響を制限した（図２３Ｂ、Ｄ、Ｅ）。これらの濃度及び時間に依存する研究は、本来の５０μＭ／４時間のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において検出されなかった別の～１０のＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基を明らかにし、このことは恐らく、データ依存性のＭＳ実験におけるペプチド発見の確率的性質を反映している。

【０５５４】

ＤＭＦでの処理後のシステイン反応における変化の一部がタンパク質発現の変化を反映し得る可能性を考慮し；しかし、多数のＣｙｓ残基は、ＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基を持つ大多数のタンパク質のためのｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰにより定量化され、このような事例の大半において、更に定量化されたＣｙｓ残基はＤＭＦ処理による影響を明らかに受けなかった（図２７Ｅ）。ＤＮＡで活性化されたタンパク質キナーゼＰＲＫＤＣを１つの典型的な例として示し、そのため、ＩＡ－アルキン反応は様々なＣｙｓ残基のために定量化され、その１つのみ（Ｃ４０４５）がＤＭＦにより遮断された（図２７Ｆ）。これらの結果は

、ＤＭＦがヒトＴ細胞におけるタンパク質発現に間接的に影響を及ぼすのではなく、特定のＣｙｓ残基のＩＡ－アルキン反応を直接損なったことを示している。

【０５５５】

ヒト及びマウスＴ細胞におけるＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基の保存

ヒト及びマウス両方のＴ細胞の活性化をＤＭＦが損なったことを考慮して、ＤＭＦ作用の媒介に潜在的に重要な少なくとも１つのＣｙｓ残基の亜群はヒト及びマウスに保存されたことが推測された。これに一貫して、ヒトＴ細胞において発見されたＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基のおよそ３分の２は、マウスに保存されている（図３０Ａ及び表７）。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験をＤＭＦ（５０μＭ、４時間）で処理したマウスＴ細胞上で行い、ヒトＴ細胞におけるＤＭＦに敏感な保存された定量化Ｃｙｓ残基のうち大部分（＞８０％）はまた、マウスＴ細胞においてこの薬物により遮断された（Ｒ値＞４）ことが分かった（図３０Ｂ及び表８－９）。これらの結果は、ＤＭＦがヒト及びマウスＴ細胞におけるＣｙｓ残基の同様のアレイを標的とすることを示しており、このことは、この求電子性の薬物のための作用の候補部位としてタンパク質の特定のセットを指し示している。

【０５５６】

ＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基を含有するタンパク質は、全体として、酵素、チャネル、輸送体、足場タンパク質、及び転写制御因子を含む様々な機能別の区分から生じた（図３０Ｃ）。これらタンパク質の中には、重要な免疫機能を持つものが幾つか存在していた（表７）。ＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基は、例えば、ＩκＢキナーゼβ（ＩＫＫβ又はＩＫＢＫＢ）、タンパク質キナーゼＣ－θ（ＰＫＣθ又はＰＲＫＣＱ）、及びＴＮＦＡＩＰ３を含む、ＮＦ－κＢシグナル経路の成分又は制御因子の何れかである、複数のタンパク質において見出された（表７）。ＮＦ－κＢ経路内のＤＭＦの作用及び潜在的にその他のこのような部位に一貫して、他の細胞型において示されるように、ＤＭＦ処理がｐ６５の核転位を遮断したことが分かった（図３１）。ＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基は、以下においても見出された：１）アデノシンデアミナーゼ酵素ＡＤＡ、ヒトにおいて重症複合免疫不全症を引き起こす有害突然変異、２）転写因子であるインターフェロン調節因子－４（ＩＲＦ４）及び－８（ＩＲＦ８）、並びに３）免疫修飾物質のサイトカインＩＬ－１６（表７）。

【０５５７】

ＤＭＦは、ＰＫＣθ－ＣＤ２８の相互作用及びＴ細胞活性化に重要なＣＸＸＣモチーフを変動させる。

ＰＫＣθは、Ｔ細胞受容体及びＣＤ２８コレセプターの結合によりＮＦ－κＢを含む多数の下流経路の活性化が生じる免疫学的シナプスでのＴ細胞シグナル伝達に関与する、重大なキナーゼである。ＰＫＣθ（－／－）マウスのＴ細胞は早期活性化を欠いている。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ分析は、ヒト（図３２Ａ）及びマウス（図３３Ａ）Ｔ細胞における２つのＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基であるＣ１４とＣ１７を同定し、これらのシステイン残基は、ＤＭＦ感受性における時間及び濃度に依存した増加を示したが（図３３Ｂ、Ｃ）、ＭＭＦ処理による影響を受けなかった（図３３Ｄ）。Ｃ１４及びＣ１７が同じトリプシンペプチド上で見出されるため、１つ又は両方の残基がＤＭＦ処理に敏感であったかどうかを区別するのは困難であったが、特定のｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において、このトリプシンペプチドは、共にＤＭＦ感度を示した２つの隣接するピークとして遊走すると思われ（図３２Ａ）、このことは、Ｃ１４とＣ１７両方のＩＡ－アルキン反応がＤＭＦ処理により遮断されることを示唆している。ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験はまた、ＤＭＦ処理により影響を受けなかったＰＫＣθにおいて第３のＣｙｓを同定し（図３２Ａ）、このことは、ＰＫＣθ発現の変化ではなくＣ１４／１７反応の減少をＤＭＦが引き起こしたことを示している。Ｃ１４とＣ１７は、他のＰＫＣアイソフォームではなくＰＫＣθのＣ２ドメインにおいて見出されるＣＸＸＣモチーフを形成する（図３２Ｂ、Ｃ）。ＰＫＣθのＣ２ドメインは近年、ホスホチロシン含有ペプチドに結合すると示され、且つ、免疫学的シナプスにてＰＫＣθの原形質膜の会合を安定させると仮定された。ＴＣＲ／ＣＤ２８での刺激後、ＰＫＣθは免疫学的シナプスに動員され、そこでは、ＰＫＣθは、ＣＤ２８の細胞質尾部と結合させることによりＣＤ２８コレセプターと相互に作用する。ＭＭＦではなくＤ

ＭＦが、マウスＴ細胞におけるＰＫＣθとＣＤ２８との相互作用を遮断したことが分かった（図３２Ｄ）。レトロウイルスの導入を使用して、ＷＴ－又はＣ１４Ｓ／Ｃ１７Ｓ－ＰＫＣθ突然変異体の何れかを持つＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞を再構成し、突然変異タンパク質はＣＤ２８と結合しないことが分かった（図３２Ｅ）。Ｃ１４Ｓ／Ｃ１７ＳＰＫＣθ突然変異体で再構成されたＰＫＣθ（－／－）Ｔ細胞はまた、ＷＴ　ＰＫＣθで再構成され、その後抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８での処置を受けた細胞と比較して、ＣＤ２５（図３２Ｆ）及びＩＬ－２（図３２Ｇ）の発現が損なわれたことを示した。総合すれば、これらのデータは、ＰＫＣθのＣ２ドメイン内のＣ１４／Ｃ１７モチーフがこのキナーゼの免疫学的シナプスへの局在化を調節し、ＤＭＦ又は遺伝子突然変異によるこのモチーフの破壊がＴ細胞活性化を損なうことを示している。

【０５５８】

プローブＡＤＡの方へのＤＭＦにおける感受性システイン残基部位

ＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基Ｃ７５は、ヒトにおいて突然変異した時に免疫抑制性の表現型に寄与する２つのアミノ酸、Ｇ７４とＲ７６の間に位置している。ＡＤＡのアミノ酸７４－７６の領域は、酵素の活性部位から２５オングストローム以上であり（図３４）、このことは、前記領域が恐らくＤＭＦ反応により混乱される非触媒性の機能を実行することを示唆している。ＩＫＢＫＢにおけるＤＭＦ感受性Ｃｙｓは、ロイシンジッパードメインに位置し、且つ、このキナーゼの活性部位に見出される別の求電子感受性Ｃｙｓ残基Ｃ１７９とは異なっている。

【０５５９】

表１はリガンド結合されたシステイン、及び、（インビトロで）細胞溶解物において実行されたｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からの断片求電子ライブラリーとの反応特性のリストを例示する。表１は更に、タンパク質の受入番号（又はタンパク質の同定子）を示す。

【０５６０】

【表２－１】
表1A

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_500 uM_ インビトロ_ 231	2_500 uM_ インビトロ_ ramos	3_500 uM_ インビトロ_ 231	3_500 uM_ インビトロ_ ramos	4_250 uM_ インビトロ_ 231	4_250 uM_ インビトロ_ ramos
Q99873_C109	PRMT1 タンパク質アルギニン N-メチルトランスフェラーゼ	17	3.1	12.6	1.3	1.8	1.1	0.2
P24752_C119	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	22	3.9	3.2	2.1	5.3	1.8	0.2
P09211_C48	GSTP1 グルタチオン S-トランスフェラーゼ P	25	3.1	1.6	2.9	1.7	3.2	0.5
O14980_C34	XPO1 エキスポーチン-1	28	2.8	4.6	1.4	1.6	1.0	0.2
P24752_C196	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	33	12.4	9.3	1.7	3.1	1.9	0.5
Q15084_C55	PDIA6 タンパク質 ジスルフィド-イソメラーゼ A6	51	6.3	7.1	17.9	14.9	1.3	1.2
P24752_C413	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	56	18.1	--	15.3	20.0	3.3	--
P63244_C182	GNB2L1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質 サブユニット ベータ-2-	85	1.2	1.2	20.0	4.7	0.9	--
P24752_C126	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	89	20.0	--	2.6	2.4	2.1	1.2
Q15084_C190	PDIA6 タンパク質 ジスルフィド-イソメラーゼ A6	96	--	15.4	19.9	13.1	1.8	1.2
Q8TAQ2_C145	SMARCC2 SWI/SNF 複合体サブユニット SMARCC2	119	8.5	14.0	9.7	6.6	1.3	--
P68036_C86	UBE2L3 ユビキチン結合酵素 E2 L3	120	2.8	2.5	1.2	3.0	1.2	--
P15374_C95	UCHL3 ユビキチンカルボキシル-末端ヒドロラーゼアイソザイム L3	146	--	1.8	1.7	1.4	--	0.9
Q16763_C118	UBE2S ユビキチン結合酵素 E2 S	187	4.2	6.9	1.3	1.5	1.2	--
Q16822_C306	PCK2 ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	192	--	--	10.6	0.9	2.2	--
O14980_C528	XPO1 エキスポーチン-1 DLLGLCEQK K.DLLGLC*EQKR.G	218	4.9	3.1	20.0	20.0	0.9	1.1
O00170_C122	AIP AH 受容体共役タンパク質	240	12.5	6.7	7.0	3.1	2.5	0.3
O75874_C269	IDH1 イソクエン酸デヒドロ	260	20.0	--	20.0	1.0	1.6	0.6

【０５６１】

【表２－２】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_500 uM_インビトロ_231	2_500 uM_インビトロ_ramos	3_500 uM_インビトロ_231	3_500 uM_インビトロ_ramos	4_250 uM_インビトロ_231	4_250 uM_インビトロ_ramos
	ゲナーゼ							
O75362_C286	ZNF217 ジンクフィンガータンパク質 217	268	20.0	20.0	1.4	--	1.7	--
P40763_C259	STAT3 シグナル伝達性転写因子 3	283	--	--	2.5	2.9	2.0	1.9
Q9Y3Z3_C522	SAMHD1 SAM ドメインおよび HD ドメイン含有タンパク質 1	288	--	4.0	2.6	--	1.5	--
P16455_C150	MGMT メチル化-DNA-タンパク質-システインメチルトランスフェラーゼ	291	--	20.0	--	17.1	--	6.9
Q96GG9_C115	DCUN1D1 DCN1 様タンパク質 1	293	--	20.0	--	5.5	--	--
P00813_C75	ADA アデノシンデアミナーゼ	296	--	7.3	--	1.5	--	0.1
Q14790_C360	CASP8 カスパーゼ-8	335	9.8	--	3.3	2.3	12.3	--
Q15306_C194	IRF4 インターフェロン調節因子 4	338	--	--	--	20.0	--	--
Q6L8Q7_C108	PDE12 2,5-ホスホジエステラーゼ 12	339	--	5.1	3.6	1.8	--	--
P48735_C308	IDH2 イソクエン酸デヒドロゲナーゼ	360	1.4	--	2.2	--	0.7	--
Q86UV5_C39	USP48 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 48	381	--	7.1	1.8	1.5	1.4	1.4
P50851_C1704	LRBA リポ多糖類反応性及びベージュ様アンカー	388	--	3.4	--	3.6	--	1.5
O94953_C694	KDM4B リジン特異的デメチラーゼ 4B	395	20.0	5.1	20.0	7.4	20.0	--
P19447_C342	ERCC3 TFIIH 基本転写因子複合体ヘリカーゼ	402	20.0	--	12.1	--	1.6	1.1
Q00535_C157	CDK5 サイクリン依存性キナーゼ 5	407	--	3.2	--	20.0	--	1.3
Q9UPT9_C171	USP22 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 22	413	--	7.1	--	--	--	4.0
Q9HB90_C377	RRAGC Ras 関連 GTP 結合タンパク質 C	417	20.0	--	3.7	--	3.5	--
P50851_C2675	LRBA リポ多糖類反応性及びベージュ様アンカー	426	--	3.0	--	5.1	1.1	--
Q9NYL2_C22	MLTK マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ MLT	430	20.0	--	1.8	--	20.0	--
Q5T1V6_C414	DDX59 高可能性 ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ DDX59	439	20.0	20.0	--	6.0	--	--
Q9HB90_	RRAGC Ras 関連 GTP 結合タ	452	20.0	20.0	1.2	--	1.5	--

【０５６２】

【表２－３】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_500 uM_ インビトロ_ 231	2_500 uM_ インビトロ_ ramos	3_500 uM_ インビトロ_ 231	3_500 uM_ インビトロ_ ramos	4_250 uM_ インビトロ_ 231	4_250 uM_ インビトロ_ ramos
C358	ンパク質 C							
P16455_ C145	MGMT メチル化-DNA--タンパク質-システイン メチルトランスフェラーゼ	470	--	20.0	--	20.0	--	20.0
Q9Y5T5_ C205	USP16 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 16	474	20.0	--	--	8.8	--	20.0
Q02556_ C306	IRF8 インターフェロン 調節因子 8	513	--	--	--	5.6	--	--
Q15910_ C503	EZH2 ヒストン-リジン N-メチルトランスフェラーゼ EZH2	557	--	2.8	--	2.0	--	1.5
Q96RU2_ C171	USP28 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 28	569	--	1.1	--	1.7	--	--
Q16877_ C159	PFKFB4 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ (bisphosphata)	582	--	--	--	12.9	1.4	--
P04150_ C302	NR3C1 グルココルチコイド受容体	600	2.3	--	7.6	--	--	--
Q96JH7_ C219	VCPIP1 脱ユビキチン化タンパク質 VCIP135	601	--	1.1	20.0	15.1	--	--
P48200_ C137	IREB2 鉄応答要素結合タンパク質 2	603	--	10.5	--	--	--	--
O00622_ C39	CYR61 タンパク質 CYR61	612	--	--	4.0	--	2.8	--
Q5T1V6_ C453	DDX59 高可能性 ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ DDX59	620	20.0	20.0	20.0	--	--	--
P51617_ C608	IRAK1 インターロイキン-1 受容体関連の キナーゼ 1	656	--	2.5	--	20.0	--	--
P42575_ C370	CASP2 カスパーゼ-2	661	--	--	--	7.4	--	--
P09086_ C346	POU2F2 POU ドメイン, クラス 2, 転写因子 2	663	--	--	1.7	5.5	--	--
Q09472_ C1738	EP300 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300	676	--	12.7	--	--	--	--
Q01201_ C109	RELB 転写因子 RelB	681	20.0	20.0	--	--	--	--
Q70CQ2_ C741	USP34 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 34	688	--	--	--	3.2	--	--
P41226_ C599	UBA7 ユビキチン様修飾酵素活性化酵素 7	702	--	--	--	--	--	20.0
P14598_ C378	NCF1 好中球細胞質因子 1	705	--	4.4	--	2.1	--	1.4
Q9C0C9_ C375	UBE2O ユビキチン結合酵素 E2O	707	--	--	9.8	4.1	--	--
O00622_	CYR61 タンパク質 CYR61	713	--	--	20.0	--	--	--

【０５６３】

【表２－４】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_500 uM_ インビトロ_ 231	2_500 uM_ インビトロ_ ramos	3_500 uM_ インビトロ_ 231	3_500 uM_ インビトロ_ ramos	4_250 uM_ インビトロ_ 231	4_250 uM_ インビトロ_ ramos
C134								
O00541_C361	PES1 Pescadillo 相同体	718	--	--	1.5	--	--	--
P43403_C117	ZAP70 チロシン-タンパク質キナーゼ ZAP-70	726	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	PELI1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ ペリノ 相同体 1	729	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	USP22 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 22	737	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	KDM3A リジン特異的 デメチラーゼ 3A	753	--	--	4.4	4.0	--	--
Q70CQ2_C1090	USP34 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 34	761	--	--	--	19.7	--	--
O00622_C70	CYR61 タンパク質 CYR61	762	--	--	20.0	--	--	--
P04150_C622	NR3C1 グルココルチコイド受容体	765	--	--	20.0	--	--	--

【０５６４】

【表３－１】
表1B

識別子	5_500uM_インビトロ_231	5_500uM_インビトロ_ramos	6_500uM_インビトロ_231	7_500uM_インビトロ_231	7_500uM_インビトロ_ramos	8_500uM_インビトロ_231	8_500uM_インビトロ_ramos	9_500uM_インビトロ_231	9_500uM_インビトロ_ramos	10_500uM_インビトロ_231
Q99873_C109	0.9	1.3	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.0	1.5	2.3
P24752_C119	1.8	2.4	1.1	2.3	2.0	1.8	0.7	2.2	3.1	1.5
P09211_C48	2.2	2.4	1.2	1.8	0.9	2.6	2.0	2.3	1.4	1.4
O14980_C34	1.1	1.2	1.2	1.7	1.8	2.4	1.5	1.2	1.1	1.2
P24752_C196	1.5	2.2	1.0	1.9	--	2.7	1.5	3.1	2.1	2.5
Q15084_C55	0.9	1.1	1.0	1.0	--	4.7	2.2	1.4	1.0	20.0
P24752_C413	1.3	--	1.1	4.2	--	1.4	2.1	15.3	--	13.0
P63244_C182	1.5	1.4	1.5	1.5	--	0.9	1.2	0.9	0.8	1.1
P24752_C126	0.9	1.3	0.9	2.2	--	2.1	12.6	1.4	--	3.2
Q15084_C190	--	1.7	1.1	1.0	1.2	20.0	2.7	2.0	1.3	--
Q8TAQ2_C145	--	2.8	--	1.0	--	3.1	1.7	1.0	1.6	4.2
P68036_C86	--	4.8	1.8	0.9	--	1.4	1.0	0.8	1.5	1.1
P15374_C95	1.5	1.1	1.1	0.8	--	20.0	1.2	1.0	1.2	2.0
Q16763_C118	2.8	--	--	1.5	--	--	1.1	0.8	1.0	1.7
Q16822_C306	1.7	--	--	1.4	--	2.2	1.0	1.3	--	1.9
O14980_C528	20.0	--	0.7	0.7	--	1.8	--	0.8	0.7	0.8
O00170_C122	--	--	--	--	--	--	1.3	--	1.1	--
O75874_C269	--	0.8	--	1.2	--	12.4	--	--	1.4	20.0
O75362_C286	--	--	0.9	1.3	--	1.8	--	1.2	--	1.1
P40763_C259	--	--	0.6	1.3	1.8	1.8	1.7	1.5	1.2	3.4
Q9Y3Z3_C522	--	5.4	--	--	--	1.8	1.1	1.0	--	1.8
P16455_C150	--	9.6	--	--	20.0	--	15.8	--	4.0	--
Q96GG9_C115	--	--	--	--	1.6	--	1.4	--	1.3	1.3
P00813_C75	--	2.5	--	--	1.4	--	1.3	1.3	1.1	--
Q14790_C360	1.0	1.3	--	--	--	--	1.4	--	--	2.8
Q15306_C194	--	2.2	--	--	--	--	2.1	--	1.1	--
Q6L8Q7_C108	--	--	--	--	--	--	--	1.3	--	--
P48735_C308	0.8	--	--	0.9	--	1.3	--	1.4	--	1.1
Q86UV5_C39	--	1.2	--	--	--	--	--	0.8	0.9	2.5
P50851_C1704	--	3.6	--	1.8	1.6	--	1.2	1.0	1.2	--
O94953_C694	--	--	1.1	--	--	20.0	1.1	1.2	1.0	--
P19447_C342	--	4.1	1.1	1.3	2.0	5.9	--	2.5	--	3.0
Q00535_C157	--	20.0	--	--	--	--	1.3	1.2	0.8	--
Q9UPT9_C171	--	20.0	--	--	3.2	--	2.3	--	--	--
Q9HB90_C377	--	--	--	--	--	5.1	--	1.9	--	--
P50851_C2675	--	20.0	--	--	--	--	1.1	1.5	--	--
Q9NYL2_C22	20.0	--	--	3.1	--	--	--	20.0	--	--
Q5T1V6_C414	--	--	--	--	--	--	2.0	--	--	--

【０５６５】

【表３－２】

識別子	5_500uM_インビトロ_231	5_500uM_インビトロ_ramos	6_500uM_インビトロ_231	7_500uM_インビトロ_231	7_500uM_インビトロ_ramos	8_500uM_インビトロ_231	8_500uM_インビトロ_ramos	9_500uM_インビトロ_231	9_500uM_インビトロ_ramos	10_500uM_インビトロ_231
Q9HB90_C358	--	--	1.2	--	--	--	--	1.9	--	--
P16455_C145	--	2.0	--	--	--	--	20.0	--	20.0	--
Q9Y5T5_C205	--	1.1	--	--	--	--	20.0	--	--	--
O00541_C272	--	12.3	--	--	--	--	1.6	--	--	--
Q02556_C306	--	2.6	--	--	20.0	--	2.2	--	1.0	--
Q15910_C503	--	20.0	1.8	--	--	--	--	1.1	--	--
Q96RU2_C171	--	--	0.8	--	--	7.5	--	1.1	--	1.4
Q16877_C159	--	20.0	--	--	--	--	1.0	1.5	--	1.2
P04150_C302	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4.1
Q96JH7_C219	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P48200_C137	--	--	--	--	2.2	--	1.6	--	--	--
O00622_C39	--	--	--	--	--	--	--	2.0	--	--
Q5T1V6_C453	--	--	--	--	--	20.0	--	2.1	--	--
P51617_C608	--	10.1	--	--	--	--	--	--	--	--
P42575_C370	--	--	--	--	--	--	2.0	--	1.2	--
P09086_C346	--	4.6	--	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	20.0	--	--	--	--	--	1.5	--	--
Q01201_C109	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	4.0	--	--	--	--	1.3	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	1.7	--	20.0
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--	20.0
Q96FA3_C282	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	20.0	--	--	--	--	1.5	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５６６】

【表４－１】
表１Ｃ

識別子	10_500uM_インビトロ_ramos	11_500uM_インビトロ_231	11_500uM_インビトロ_ramos	12_500uM_インビトロ_231	12_500uM_インビトロ_ramos	13_500uM_インビトロ_231	13_500uM_インビトロ_ramos	14_500uM_インビトロ_231	14_500uM_インビトロ_ramos	15_500uM_インビトロ_231
Q99873_C109	1.3	20.0	20.0	1.4	1.3	1.0	0.9	0.8	1.4	0.9
P24752_C119	1.4	1.2	0.9	1.0	0.7	1.2	0.6	1.2	1.8	1.0
P09211_C48	0.8	1.7	1.1	2.9	1.1	1.5	1.2	3.2	2.1	2.5
O14980_C34	0.7	1.2	1.0	1.2	0.7	0.9	0.7	1.1	1.5	--
P24752_C196	1.7	1.5	1.3	1.2	0.9	1.6	1.7	1.1	1.4	0.9
Q15084_C55	--	20.0	20.0	3.7	3.1	1.9	1.1	1.0	1.4	0.8
P24752_C413	1.6	1.9	1.7	1.5	1.1	5.5	7.3	1.3	1.6	1.2
P63244_C182	1.1	1.0	1.1	0.9	0.8	1.4	0.8	1.2	1.5	--
P24752_C126	1.5	1.5	--	1.0	1.1	9.6	20.0	1.1	1.4	0.8
Q15084_C190	3.3	20.0	20.0	--	20.0	1.5	1.3	1.1	1.8	0.9
Q8TAQ2_C145	--	20.0	--	2.8	1.6	--	0.8	1.1	2.3	--
P68036_C86	0.4	--	1.0	--	--	1.1	0.8	1.0	1.1	--
P15374_C95	--	0.8	0.8	--	0.5	--	0.8	1.2	1.0	--
Q16763_C118	--	--	--	--	0.6	--	0.7	0.7	1.2	--
Q16822_C306	1.1	3.2	1.2	1.5	0.7	0.9	1.0	--	20.0	--
O14980_C528	--	1.0	0.7	1.1	--	--	0.5	20.0	20.0	0.8
O00170_C122	1.7	--	2.8	--	1.3	--	0.9	--	2.5	--
O75874_C269	--	1.1	0.7	--	--	2.7	--	0.9	1.3	--
O75362_C286	--	1.2	1.2	1.0	--	0.9	0.9	0.9	--	--
P40763_C259	--	20.0	20.0	--	--	--	1.2	0.8	3.1	--
Q9Y3Z3_C522	--	2.1	--	--	--	0.8	--	1.7	1.5	--
P16455_C150	20.0	--	20.0	--	20.0	--	4.2	5.5	5.1	--
Q96GG9_C115	1.0	--	0.9	--	0.6	--	--	1.1	1.6	--
P00813_C75	1.0	--	7.5	--	0.7	--	0.9	1.5	1.7	--
O14933_C98	--	--	3.4	--	1.3	--	1.0	--	2.8	--
Q14790_C360	1.5	20.0	20.0	--	--	--	--	1.4	1.9	--
Q15306_C194	2.5	--	4.3	--	3.7	--	1.1	1.3	2.2	--
Q6L8Q7_C108	--	4.2	--	--	1.5	--	1.0	0.5	2.2	1.1
P48735_C308	--	1.1	--	1.7	--	1.1	--	4.7	--	--
Q86UV5_C39	--	--	1.0	--	--	0.8	0.6	0.8	--	--
P50851_C1704	0.8	--	1.4	--	--	0.7	0.8	1.9	1.7	--
O94953_C694	1.4	--	1.9	--	--	1.4	1.1	--	2.0	--
P19447_C342	--	2.9	1.5	3.0	--	1.0	--	4.7	--	--
Q00535_C157	--	--	1.3	--	1.0	--	--	6.1	2.3	--
Q9UPT9_C171	3.8	--	8.2	--	4.1	--	0.8	4.0	4.0	--
Q9HB90_C377	--	--	1.6	--	--	2.1	--	--	20.0	--
P50851_C2675	1.3	--	1.3	--	1.5	--	--	1.9	2.9	--
Q9NYL2_C22	--	--	--	--	--	5.2	--	1.6	--	--

【０５６７】

【表４－２】

識別子	10_500uM_インビトロ_ramos	11_500uM_インビトロ_231	11_500uM_インビトロ_ramos	12_500uM_インビトロ_231	12_500uM_インビトロ_ramos	13_500uM_インビトロ_231	13_500uM_インビトロ_ramos	14_500uM_インビトロ_231	14_500uM_インビトロ_ramos	15_500uM_インビトロ_231
Q5T1V6_C414	--	--	--	--	--	--	1.2	--	4.0	--
Q9HB90_C358	--	--	--	--	--	1.5	--	0.9	2.1	1.1
P16455_C145	--	--	20.0	--	--	--	20.0	1.5	2.0	--
Q9Y5T5_C205	--	20.0	--	2.2	--	--	3.3	--	--	--
O00541_C272	2.2	--	4.2	--	--	1.7	--	2.6	--	--
Q02556_C306	3.6	--	3.1	--	--	--	0.7	2.4	2.3	--
Q15910_C503	--	--	1.3	--	--	--	0.8	0.6	1.9	0.8
Q96RU2_C171	--	20.0	--	--	--	--	2.4	1.0	--	--
Q16877_C159	--	--	0.6	--	--	0.9	--	2.3	--	--
P04150_C302	--	--	1.5	--	1.3	--	--	--	2.2	--
Q96JH7_C219	--	--	--	--	--	--	--	0.6	1.5	--
P48200_C137	2.1	--	3.7	--	--	--	--	5.2	--	--
O00622_C39	--	9.6	--	--	--	1.2	--	3.6	--	--
Q5T1V6_C453	--	20.0	--	--	--	--	1.4	2.2	--	--
P51617_C608	--	--	1.3	--	--	--	--	--	--	--
P42575_C370	1.2	--	6.0	--	--	--	--	--	--	--
P09086_C346	--	--	1.7	--	--	--	0.6	--	--	--
Q09472_C1738	--	--	--	--	--	--	0.7	2.1	--	--
Q01201_C109	--	--	--	--	--	--	--	1.7	2.4	--
Q70CQ2_C741	0.9	--	--	--	--	0.8	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	1.9	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	1.1	--	--	--	--	--	0.7	--	--	--
Q9C0C9_C375	0.8	--	--	--	--	--	--	2.8	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	0.7	--	--
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	20.0	--	--	--	--	--	--	--	1.3	--
Q96FA3_C282	--	--	--	--	--	--	--	1.4	--	--
Q9UPT9_C44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	1.7	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５６８】

【表５－１】
表1D

識別子	15_500uM_インビトロ_ramos	27_500uM_インビトロ_231	20_500uM_インビトロ_231	20_500uM_インビトロ_ramos	21_500uM_インビトロ_231	21_500uM_インビトロ_ramos	22_500uM_インビトロ_231	22_500uM_インビトロ_ramos	23_500uM_インビトロ_231	23_500uM_インビトロ_ramos
Q99873_C109	1.2	0.7	1.9	2.2	1.1	1.5	1.0	1.0	0.8	1.0
P24752_C119	1.2	0.9	3.6	2.6	0.9	1.1	1.0	0.8	1.7	2.0
P09211_C48	1.3	1.3	2.5	1.1	1.1	1.3	0.9	0.7	0.8	0.9
O14980_C34	1.2	0.9	1.0	1.2	0.9	1.2	1.1	--	3.4	5.3
P24752_C196	1.6	0.9	3.7	2.9	1.0	1.1	1.4	0.7	--	1.8
Q15084_C55	1.0	0.8	1.7	2.0	1.1	2.1	2.1	1.6	0.8	1.0
P24752_C413	0.9	0.9	20.0	14.0	1.4	1.4	1.1	1.1	1.1	1.2
P63244_C182	1.3	1.0	1.4	1.1	0.9	0.9	1.6	--	4.6	--
P24752_C126	--	0.9	10.6	20.0	1.2	1.4	2.4	1.7	0.8	0.8
Q15084_C190	1.2	0.9	2.1	2.1	1.1	2.3	2.2	4.2	0.8	1.1
Q8TAQ2_C145	1.2	0.9	2.9	3.9	1.2	--	--	1.2	1.3	--
P68036_C86	1.3	1.2	1.1	1.2	1.2	2.0	--	0.8	7.4	13.2
P15374_C95	0.7	0.4	1.0	0.9	1.1	--	--	0.7	0.8	1.1
Q16763_C118	1.2	0.8	--	2.9	0.9	--	--	0.9	1.6	2.4
Q16822_C306	--	1.4	2.5	1.6	1.2	2.0	--	--	3.0	--
O14980_C528	1.0	1.2	1.4	4.0	0.9	0.8	--	--	--	2.9
O00170_C122	1.4	0.4	--	2.2	1.4	--	1.3	1.1	0.7	1.4
O75874_C269	0.6	0.4	--	0.6	1.5	--	1.0	--	0.7	1.1
O75362_C286	--	20.0	1.3	--	0.9	--	--	--	20.0	--
P40763_C259	1.9	0.7	--	3.0	--	2.9	2.0	--	1.1	0.8
Q9Y3Z3_C522	1.6	0.8	2.1	1.3	--	1.4	--	0.8	--	--
P16455_C150	1.9	1.0	--	18.3	--	17.2	--	2.9	--	1.0
Q96GG9_C115	0.8	1.1	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0	0.8	--	20.0
P00813_C75	1.1	1.1	--	1.5	--	1.3	--	1.3	--	1.1
O14933_C98	1.3	1.2	--	3.9	--	--	--	2.0	0.7	1.2
Q14790_C360	--	0.8	1.9	1.5	1.9	1.9	--	--	1.4	1.4
Q15306_C194	2.2	--	--	3.0	--	1.7	--	1.1	--	1.9
Q6L8Q7_C108	--	0.5	1.6	--	--	--	--	--	1.0	--
P48735_C308	--	1.9	0.5	--	0.6	--	--	--	--	--
Q86UV5_C39	0.7	0.8	1.1	1.8	20.0	1.2	--	--	--	1.3
P50851_C1704	1.9	--	2.0	1.7	--	1.6	--	--	--	3.4
O94953_C694	1.1	1.4	2.8	2.0	--	1.8	--	--	--	3.2
P19447_C342	--	0.8	2.6	--	6.1	--	--	--	1.6	--
Q00535_C157	--	--	--	2.0	--	--	--	0.9	--	2.8
Q9UPT9_C171	--	--	--	20.0	--	--	--	1.1	--	5.1
Q9HB90_C377	--	1.0	--	--	1.4	--	1.7	0.9	1.5	--
P50851_C2675	1.6	--	--	--	0.9	1.5	1.1	1.1	--	2.6
Q9NYL2_C22	--	1.1	20.0	--	2.0	--	1.0	--	1.4	--

【０５６９】

【表５－２】

識別子	15_500uM_インビトロ_ramos	27_500uM_インビトロ_231	20_500uM_インビトロ_231	20_500uM_インビトロ_ramos	21_500uM_インビトロ_231	21_500uM_インビトロ_ramos	22_500uM_インビトロ_231	22_500uM_インビトロ_ramos	23_500uM_インビトロ_231	23_500uM_インビトロ_ramos
Q5T1V6_C414	1.0	0.8	--	3.1	1.2	--	--	1.3	--	1.4
Q9HB90_C358	--	0.3	--	--	1.2	--	1.7	--	--	--
P16455_C145	1.3	--	--	20.0	--	--	--	--	--	1.0
Q9Y5T5_C205	--	1.6	--	--	1.6	--	--	1.6	--	1.2
O00541_C272	--	1.1	--	--	--	5.5	1.6	--	--	2.0
Q02556_C306	2.1	--	--	2.1	--	--	--	--	--	--
Q15910_C503	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2.0
Q96RU2_C171	--	0.9	--	2.4	1.1	--	--	--	--	1.2
Q16877_C159	--	--	--	1.0	--	1.2	--	--	--	1.0
P04150_C302	0.9	1.3	--	--	--	--	--	0.9	--	4.7
Q96JH7_C219	1.3	1.7	--	1.2	--	--	--	--	--	--
P48200_C137	2.0	1.4	--	5.2	--	--	--	--	--	1.6
O00622_C39	--	1.0	--	--	--	--	--	--	4.4	--
Q5T1V6_C453	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.5
P42575_C370	--	0.9	--	--	--	--	--	--	--	2.1
P09086_C346	0.8	--	--	2.3	0.9	--	--	--	--	1.1
Q09472_C1738	--	--	--	3.2	--	--	--	--	--	--
Q01201_C109	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	1.3
Q70CQ2_C741	--	--	2.8	1.7	--	1.7	--	--	--	--
P41226_C599	--	0.7	1.1	12.2	--	2.5	--	--	--	3.2
P14598_C378	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	0.7	--	--	--	2.4	--	--	--	1.4
O00622_C134	--	1.5	20.0	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	0.6	20.0	20.0	--	--	--	--	--	1.1
P43403_C117	20.0	--	--	20.0	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	0.7	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	2.7	--	0.9	--	--	--	--
O00622_C70	--	1.1	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７０】

【表６－１】
表1E

識別子	24_500 uM_インビトロ_ramos	25_500 uM_インビトロ_231	26_500 uM_インビトロ_ramos	27_500 uM_インビトロ_231	27_500 uM_インビトロ_ramos	28_500 uM_インビトロ_231	28_500 uM_インビトロ_ramos	29_500 uM_インビトロ_231	29_500 uM_インビトロ_ramos	30_500 uM_インビトロ_231
Q99873_C109	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.8	1.1	1.0	0.9	1.1
P24752_C119	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3	0.6	0.7
P09211_C48	1.6	1.8	0.9	1.0	1.0	1.3	1.5	1.0	0.4	1.4
O14980_C34	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	1.3	0.9	0.7
P24752_C196	1.1	0.9	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.3	1.0	0.8
Q15084_C55	1.3	1.0	0.9	1.1	1.2	1.1	1.5	1.0	1.3	2.2
P24752_C413	1.2	1.0	0.9	1.1	1.3	1.2	1.4	1.3	0.7	1.1
P63244_C182	2.6	1.2	1.0	0.8	1.1	1.0	1.1	1.3	1.2	1.2
P24752_C126	1.1	0.9	0.9	1.0	1.3	1.7	1.6	1.1	0.8	1.1
Q15084_C190	1.7	1.0	0.9	--	1.1	1.1	1.6	1.2	--	2.3
Q8TAQ2_C145	5.4	0.9	0.9	--	1.2	1.1	1.2	1.0	--	1.1
P68036_C86	--	1.5	0.7	0.9	--	1.4	--	0.9	1.5	--
P15374_C95	1.1	0.8	0.8	--	1.0	1.1	0.9	0.9	1.0	0.7
Q16763_C118	1.2	1.0	0.9	--	0.9	1.0	0.8	--	--	0.7
Q16822_C306	--	0.8	--	1.5	1.1	1.1	--	1.1	0.5	1.2
O14980_C528	20.0	--	0.9	0.9	0.8	--	--	1.0	--	--
O00170_C122	1.3	--	0.9	--	1.0	0.9	1.2	--	1.3	1.1
O75874_C269	0.9	1.0	--	1.0	--	1.1	--	0.8	--	0.7
O75362_C286	--	20.0	--	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	--	--
P40763_C259	1.7	0.9	--	--	--	1.0	1.1	1.5	--	--
Q9Y3Z3_C522	1.1	--	0.9	1.0	0.9	1.0	--	1.5	--	0.7
P16455_C150	4.0	--	0.9	--	2.3	--	1.7	--	1.3	--
Q96GG9_C115	1.7	--	0.9	--	1.0	--	--	--	--	0.7
P00813_C75	1.2	--	0.8	--	1.0	--	0.9	--	--	--
O14933_C98	--	--	1.0	--	1.0	--	1.2	--	--	1.3
Q14790_C360	1.4	1.0	--	--	1.2	1.1	--	--	--	2.0
Q15306_C194	1.9	--	1.1	--	1.0	--	1.1	--	1.2	--
Q6L8Q7_C108	1.4	0.8	1.1	--	1.3	1.0	1.2	--	--	1.1
P48735_C308	--	14.5	--	1.0	--	0.9	--	1.0	--	0.7
Q86UV5_C39	1.0	1.0	--	--	--	--	--	1.2	--	--
P50851_C1704	1.3	0.8	--	1.1	--	--	--	--	--	--
O94953_C694	--	--	--	1.0	--	--	--	1.2	--	--
P19447_C342	--	0.9	--	1.1	--	--	--	0.8	--	1.3
Q00535_C157	--	--	0.9	--	1.0	0.9	1.0	--	--	--
Q9UPT9_C171	3.1	1.1	1.0	--	1.2	--	1.3	--	--	--
Q9HB90_C377	1.5	1.0	--	--	--	1.3	--	1.3	--	1.4
P50851_C2675	1.0	--	0.9	--	--	--	--	1.1	--	0.9
Q9NYL2_C22	--	0.8	--	--	--	1.4	--	1.2	--	1.1
Q5T1V6_C414	1.7	--	--	--	1.0	--	--	--	--	--
Q9HB90_C358	0.9	0.9	--	--	--	1.1	--	--	--	1.0
P16455_C145	20.0	--	--	--	20.0	--	20.0	--	20.0	--
Q9Y5T5_C205	--	--	--	--	0.9	--	1.6	--	--	--
O00541_C272	2.6	--	--	--	--	--	--	0.9	--	--
Q02556_C306	1.2	--	--	--	1.1	--	--	--	--	--
Q15910_C503	1.3	0.8	--	--	--	--	--	1.4	--	--
Q96RU2_C171	--	--	--	1.2	--	--	--	--	--	--
Q16877_C159	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C302	--	--	--	1.0	--	--	--	--	--	--

【０５７１】

【表６－２】

識別子	24_500 uM_インビトロ_ramos	25_500 uM_インビトロ_231	26_500 uM_インビトロ_ramos	27_500 uM_インビトロ_231	27_500 uM_インビトロ_ramos	28_500 uM_インビトロ_231	28_500 uM_インビトロ_ramos	29_500 uM_インビトロ_231	29_500 uM_インビトロ_ramos	30_500 uM_インビトロ_231
Q96JH7_C219	1.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P48200_C137	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C39	--	1.0	--	--	--	1.0	--	--	--	--
Q5T1V6_C453	1.7	0.9	--	1.0	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	1.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P42575_C370	2.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P09086_C346	1.1	0.7	--	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	1.6	--	1.0	--	--	--	1.3	--	--
Q01201_C109	1.5	--	--	--	--	--	1.1	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	1.3	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	1.0	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	--	--	2.0	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	--	1.1	--	--	--
Q96FA3_C282	--	--	0.5	--	--	--	0.7	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	--	--	--	1.2	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	1.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７２】

【表７－１】
表１Ｆ

識別子	30_500 uM_インビトロ_ramos	31_500 uM_インビトロ_231	31_500 uM_インビトロ_ramos	32_500 uM_インビトロ_231	32_500 uM_インビトロ_ramos	33_500 uM_インビトロ_231	33_500 uM_インビトロ_ramos	34_500 uM_インビトロ_231	34_500 uM_インビトロ_ramos	35_500 uM_インビトロ_231
Q99873_C109	1.8	1.0	1.3	1.7	1.8	1.0	0.9	0.8	1.1	0.8
P24752_C119	0.9	1.3	0.7	1.7	1.3	0.7	0.7	0.8	--	0.9
P09211_C48	1.2	2.0	1.3	1.9	1.4	2.0	0.7	0.8	1.0	0.7
O14980_C34	1.1	1.0	0.8	1.2	1.0	0.8	0.9	0.8	1.1	0.8
P24752_C196	1.1	1.2	0.9	2.3	2.0	0.9	1.3	0.8	1.0	0.9
Q15084_C55	--	1.2	1.1	20.0	20.0	3.3	--	0.9	--	0.9
P24752_C413	1.9	1.6	1.0	6.8	4.1	1.3	--	0.9	1.3	--
P63244_C182	1.6	1.3	--	1.9	--	--	1.1	--	--	0.9
P24752_C126	1.6	1.1	--	7.3	8.6	4.3	--	--	1.1	--
Q15084_C190	--	1.3	1.2	20.0	20.0	3.3	--	0.9	--	0.9
Q8TAQ2_C145	1.5	1.1	0.9	20.0	20.0	--	1.5	--	--	0.9
P68036_C86	1.5	1.7	1.3	1.1	0.9	--	0.9	--	--	--
P15374_C95	1.0	0.9	0.7	1.2	1.0	--	--	--	--	--
Q16763_C118	1.1	0.9	0.8	1.1	1.1	--	--	--	--	--
Q16822_C306	1.1	1.9	1.2	3.2	--	--	--	--	--	0.9
O14980_C528	--	5.2	3.2	1.7	1.2	--	--	--	1.1	--
O00170_C122	2.0	--	0.6	3.7	1.9	--	--	1.0	--	--
O75874_C269	--	0.4	0.7	--	--	1.2	--	--	--	--
O75362_C286	2.1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P40763_C259	--	1.7	--	10.2	--	--	--	--	--	--
Q9Y3Z3_C522	--	1.5	--	--	1.8	0.8	--	--	--	--
P16455_C150	5.1	--	2.8	--	20.0	--	1.9	--	1.4	--
Q96GG9_C115	1.1	--	0.9	--	0.9	--	--	--	--	--
P00813_C75	3.1	--	0.8	--	1.7	--	0.8	--	1.1	--
O14933_C98	2.1	--	--	13.8	4.6	--	1.2	0.8	--	--
Q14790_C360	5.2	--	--	--	--	3.1	--	--	--	--
Q15306_C194	1.7	--	1.1	--	3.7	--	1.1	--	--	--
Q6L8Q7_C108	1.6	2.0	--	2.5	1.9	--	--	--	--	0.8
P48735_C308	--	1.3	1.1	--	--	--	--	--	--	--
Q86UV5_C39	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P50851_C1704	--	--	1.4	--	2.0	--	--	--	--	--
O94953_C694	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P19447_C342	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q00535_C157	--	--	1.1	1.7	1.7	--	--	0.7	--	--
Q9UPT9_C171	2.3	2.1	--	--	9.3	--	--	--	--	--
Q9HB90_C377	--	2.2	--	--	1.5	1.1	--	--	--	--
P50851_C2675	--	--	--	1.8	1.1	--	--	--	1.1	--
Q9NYL2_C22	--	--	--	2.1	--	3.7	--	0.8	--	--
Q5T1V6_C414	2.0	--	--	--	--	--	--	0.6	--	--
Q9HB90_C358	--	2.3	--	1.9	1.2	--	--	--	--	--
P16455_C145	--	--	1.0	--	20.0	--	--	--	--	--
Q9Y5T5_C205	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C272	--	--	--	--	--	1.4	--	--	--	0.8
Q02556_C306	2.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q15910_C503	--	--	--	--	1.7	--	--	--	--	--
Q96RU2_C171	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q16877_C159	--	--	--	--	1.5	--	--	--	1.4	--
P04150_C302	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７３】

【表７－２】

識別子	30_500 uM_インビトロ_ramos	31_500 uM_インビトロ_231	31_500 uM_インビトロ_ramos	32_500 uM_インビトロ_231	32_500 uM_インビトロ_ramos	33_500 uM_インビトロ_231	33_500 uM_インビトロ_ramos	34_500 uM_インビトロ_231	34_500 uM_インビトロ_ramos	35_500 uM_インビトロ_231
Q96JH7_C219	--	--	1.0	--	--	--	--	--	--	--
P48200_C137	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C39	--	1.2	--	--	--	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C453	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	--	--	--	5.8	2.9	--	--	--	--	--
P42575_C370	4.1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P09086_C346	--	--	0.6	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q01201_C109	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	4.2	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	1.7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	4.8	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７４】

【表８－１】
表1G

識別子	35_500 uM_インビトロ_ramos	36_500 uM_インビトロ_231	37_500 uM_インビトロ_ramos	38_500 uM_インビトロ_231	38_500 uM_インビトロ_ramos	39_500 uM_インビトロ_231	40_500 uM_インビトロ_231	40_500 uM_インビトロ_ramos	41_500 uM_インビトロ_231	41_500 uM_インビトロ_ramos
Q99873_C109	1.0	1.0	1.0	0.9	1.4	1.5	0.8	1.3	0.9	0.9
P24752_C119	1.0	1.2	0.8	1.0	1.7	1.7	0.8	0.9	1.0	0.8
P09211_C48	1.3	1.6	1.2	1.9	--	2.0	1.6	1.6	1.3	0.9
O14980_C34	1.3	1.3	0.9	1.0	1.0	1.3	0.8	1.1	3.1	2.0
P24752_C196	1.4	1.5	1.0	1.0	1.3	3.0	0.8	--	1.3	1.0
Q15084_C55	--	--	1.0	1.0	1.3	3.9	0.8	--	0.9	0.8
P24752_C413	1.3	2.7	0.9	1.1	20.0	2.7	0.9	--	0.8	0.9
P63244_C182	0.9	1.3	0.9	1.1	--	1.0	1.0	0.6	--	4.7
P24752_C126	10.4	--	0.9	1.0	1.4	--	0.9	--	1.0	0.9
Q15084_C190	--	--	1.1	1.1	--	7.0	0.9	1.7	1.0	--
Q8TAQ2_C145	--	--	--	1.1	1.9	1.2	0.9	1.1	1.8	2.8
P68036_C86	--	--	--	--	1.5	1.9	0.8	0.9	9.8	7.9
P15374_C95	--	--	--	2.7	12.5	--	--	0.9	1.0	0.8
Q16763_C118	--	--	--	1.0	1.0	1.4	0.9	0.8	--	3.4
Q16822_C306	1.0	--	1.0	1.0	--	--	--	--	1.2	1.0
O14980_C528	0.8	--	0.9	1.0	--	--	--	--	0.6	--
O00170_C122	--	--	--	1.5	1.5	--	--	--	1.1	1.0
O75874_C269	--	1.7	--	0.7	--	--	--	0.8	0.8	--
O75362_C286	--	--	0.9	0.9	1.2	20.0	--	--	--	0.6
P40763_C259	1.1	--	0.9	--	1.5	--	--	1.4	0.9	--
Q9Y3Z3_C522	--	--	0.7	--	--	1.1	0.8	--	0.9	--
P16455_C150	1.3	--	1.0	--	1.8	--	--	1.9	--	0.9
Q96GG9_C115	0.9	--	0.8	1.2	1.0	--	--	0.9	--	--
P00813_C75	1.1	--	0.9	--	2.3	--	--	0.9	--	1.1
O14933_C98	--	--	--	1.6	1.7	--	--	1.3	1.2	1.1
Q14790_C360	1.3	--	1.0	1.0	4.1	--	--	--	1.0	0.8
Q15306_C194	1.0	--	0.9	--	2.1	--	--	1.1	--	1.2
Q6L8Q7_C108	--	--	--	0.9	6.8	3.2	0.8	--	1.3	--
P48735_C308	--	1.3	--	1.2	--	--	--	--	--	--
Q86UV5_C39	1.0	--	0.7	3.7	--	--	--	1.6	--	--
P50851_C1704	1.1	--	1.0	--	2.5	--	--	--	--	--
O94953_C694	1.1	--	1.1	--	2.4	--	--	--	--	--
P19447_C342	--	--	--	1.3	--	--	--	--	1.1	--
Q00535_C157	--	--	--	0.9	--	--	--	--	1.5	--
Q9UPT9_C171	1.5	--	--	1.4	--	--	--	--	3.0	1.4
Q9HB90_C377	--	--	--	1.0	--	--	--	--	1.1	--
P50851_C2675	1.0	--	1.0	--	--	--	--	--	1.9	--
Q9NYL2_C22	--	--	--	1.2	--	--	--	--	1.5	--
Q5T1V6_C414	1.3	--	1.0	0.9	1.8	--	--	1.4	1.2	1.0
Q9HB90_C358	--	--	--	1.1	--	--	--	--	1.3	--
P16455_C145	--	--	--	--	--	--	--	1.0	1.9	--
Q9Y5T5_C205	--	--	--	--	1.9	--	--	0.9	0.8	--
O00541_C272	1.2	--	1.0	1.0	--	--	--	--	--	--
Q02556_C306	1.2	--	--	--	--	--	--	0.9	--	1.4
Q15910_C503	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96RU2_C171	--	--	--	3.3	--	--	--	--	--	--
Q16877_C159	--	--	--	--	--	--	--	1.2	--	--
P04150_C302	0.9	--	0.9	--	--	--	--	--	--	--

【０５７５】

【表８－２】

識別子	35_500 uM_インビトロ_ramos	36_500 uM_インビトロ_231	37_500 uM_インビトロ_ramos	38_500 uM_インビトロ_231	38_500 uM_インビトロ_ramos	39_500 uM_インビトロ_231	40_500 uM_インビトロ_231	40_500 uM_インビトロ_ramos	41_500 uM_インビトロ_231	41_500 uM_インビトロ_ramos
Q96JH7_C219	--	--	--	--	1.8	--	--	1.9	--	--
P48200_C137	1.1	--	0.9	--	--	--	--	1.1	1.2	--
O00622_C39	--	--	--	0.8	--	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C453	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	--	--	--	--	2.4	--	--	--	1.1	--
P42575_C370	--	--	0.7	--	--	--	--	2.7	--	1.4
P09086_C346	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q01201_C109	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	--	1.1	--	4.1	--	--	--	--	--
P41226_C599	1.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	--	--	--	--	7.0	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７６】

【表９－１】
表1H

識別子	42_500 uM_インビトロ_ramos	43_500 uM_インビトロ_231	43_500 uM_インビトロ_ramos	44_500 uM_インビトロ_231	45_500 uM_インビトロ_231	46_500 uM_インビトロ_231	47_500 uM_インビトロ_231	48_500 uM_インビトロ_231	49_500 uM_インビトロ_231	50_500 uM_インビトロ_231
Q99873_C109	0.9	1.4	1.2	0.8	2.2	0.8	0.9	1.0	2.0	1.0
P24752_C119	0.8	1.8	1.1	0.8	12.4	0.8	1.0	1.3	4.9	2.1
P09211_C48	0.7	4.1	2.2	0.9	19.7	1.0	2.5	1.1	--	2.3
O14980_C34	0.9	1.1	--	0.8	1.8	1.0	1.0	1.1	1.9	1.2
P24752_C196	0.8	2.4	2.3	0.8	20.0	0.9	1.1	1.3	4.7	3.9
Q15084_C55	0.9	20.0	20.0	1.0	--	0.8	0.9	1.0	12.8	1.3
P24752_C413	0.7	15.9	--	0.8	20.0	1.1	0.9	1.1	2.6	9.2
P63244_C182	0.8	0.9	0.9	--	0.9	0.8	1.1	1.1	--	0.8
P24752_C126	0.8	--	20.0	0.8	20.0	0.9	1.0	--	20.0	20.0
Q15084_C190	--	20.0	--	1.0	--	0.9	1.0	--	7.7	--
Q8TAQ2_C145	1.0	20.0	--	1.0	--	1.0	1.5	1.1	--	2.8
P68036_C86	0.8	1.1	1.7	--	--	1.2	2.0	--	1.9	--
P15374_C95	0.9	--	20.0	0.8	--	1.0	1.0	--	--	1.3
Q16763_C118	0.8	--	1.0	0.8	--	1.0	--	--	--	0.8
Q16822_C306	0.8	3.3	--	--	3.3	0.9	1.0	--	--	2.7
O14980_C528	--	4.6	--	--	--	0.7	2.2	--	--	--
O00170_C122	0.8	--	2.1	--	--	--	--	--	4.8	2.3
O75874_C269	--	0.8	--	0.8	20.0	0.6	0.9	1.0	--	20.0
O75362_C286	1.0	1.9	1.2	--	20.0	0.9	--	--	1.0	--
P40763_C259	--	--	--	--	--	1.2	--	--	--	--
Q9Y3Z3_C522	--	2.2	--	0.8	--	--	--	1.4	3.0	--
P16455_C150	0.8	--	20.0	--	--	--	--	--	--	--
Q96GG9_C115	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P00813_C75	0.8	--	1.2	--	--	--	--	--	--	--
O14933_C98	1.0	--	--	2.0	--	--	--	--	--	1.5
Q14790_C360	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q15306_C194	1.2	--	3.0	--	--	--	--	--	--	--
Q6L8Q7_C108	--	--	--	0.8	--	--	--	--	--	1.8
P48735_C308	--	0.8	--	--	1.0	0.2	1.2	1.1	--	2.2
Q86UV5_C39	--	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--
P50851_C1704	--	--	--	--	--	--	--	--	4.0	--
O94953_C694	0.9	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
P19447_C342	--	--	--	--	--	1.0	--	--	--	--
Q00535_C157	--	--	1.2	--	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C171	1.0	--	4.5	--	--	--	--	--	--	--
Q9HB90_C377	--	--	--	0.7	--	--	1.6	1.4	--	--
P50851_C2675	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9NYL2_C22	--	2.9	--	0.8	20.0	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C414	--	--	--	0.8	--	--	--	--	--	--
Q9HB90_C358	--	--	--	--	--	1.1	--	--	--	--
P16455_C145	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y5T5_C205	1.5	--	--	--	--	1.0	--	--	--	--
O00541_C272	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q02556_C306	0.9	--	2.7	--	--	--	--	--	--	--
Q15910_C503	--	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96RU2_C171	--	--	--	--	--	0.9	1.5	--	--	--
Q16877_C159	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C302	--	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７７】

【表９－２】

識別子	42_500 uM_インビトロ_ramos	43_500 uM_インビトロ_231	43_500 uM_インビトロ_ramos	44_500 uM_インビトロ_231	45_500 uM_インビトロ_231	46_500 uM_インビトロ_231	47_500 uM_インビトロ_231	48_500 uM_インビトロ_231	49_500 uM_インビトロ_231	50_500 uM_インビトロ_231
Q96JH7_C219	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P48200_C137	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C39	--	--	--	--	--	1.9	--	--	--	2.3
Q5T1V6_C453	1.0	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P42575_C370	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P09086_C346	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	2.2	--	--	--	--	--	--	--	--
Q01201_C109	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	--	1.2	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	1.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	--	2.1	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	1.0	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５７８】

【表１０－１】
表１Ｉ

識別子	51_500 uM_インビトロ_231	51_500 uM_インビトロ_ramos	52_500 uM_インビトロ_231	52_500 uM_インビトロ_ramos	53_500 uM_インビトロ_231	53_500 uM_インビトロ_ramos	54_500 uM_インビトロ_231	55_500 uM_インビトロ_231	56_500 uM_インビトロ_231	56_500 uM_インビトロ_ramos
Q99873_C109	0.9	9.5	0.9	1.3	0.9	1.1	1.2	1.0	1.0	1.1
P24752_C119	0.8	0.9	1.4	0.8	0.9	0.7	1.0	0.9	1.0	1.2
P09211_C48	1.1	1.0	1.0	1.9	2.3	1.2	1.3	1.4	1.9	1.2
O14980_C34	0.9	1.0	1.0	1.1	0.9	1.0	1.1	0.9	0.9	0.9
P24752_C196	1.1	--	1.3	1.5	1.2	0.9	1.1	1.0	1.1	1.0
Q15084_C55	2.5	2.7	1.1	1.8	0.9	1.0	1.2	0.9	1.0	1.1
P24752_C413	1.0	1.0	1.9	1.5	1.0	--	1.1	1.0	1.0	0.9
P63244_C182	0.7	0.9	1.0	--	0.9	0.8	--	1.0	1.1	--
P24752_C126	1.0	1.2	1.3	--	--	--	1.1	0.9	0.9	--
Q15084_C190	--	5.6	1.0	1.9	1.0	1.0	1.2	--	0.9	1.1
Q8TAQ2_C145	--	1.1	0.9	1.8	--	1.2	--	--	1.4	1.2
P68036_C86	--	1.0	0.8	1.3	1.0	1.0	--	1.0	1.5	1.3
P15374_C95	--	0.9	1.2	--	--	0.7	--	--	1.0	1.1
Q16763_C118	--	0.9	1.2	--	1.0	0.8	--	--	1.2	1.1
Q16822_C306	--	0.8	1.3	1.6	1.3	--	--	--	1.4	--
O14980_C528	--	0.9	1.3	--	--	0.8	--	--	20.0	--
O00170_C122	1.4	--	--	1.4	--	0.9	--	--	0.8	0.9
O75874_C269	--	--	--	--	--	--	1.1	--	0.9	--
O75362_C286	0.9	20.0	1.0	--	1.1	--	--	--	1.0	--
P40763_C259	--	--	2.2	--	--	1.9	1.3	--	--	--
Q9Y3Z3_C522	--	--	1.2	--	--	0.7	--	--	1.0	1.0
P16455_C150	--	--	--	2.2	--	1.1	--	--	--	1.4
Q96GG9_C115	--	0.8	--	1.0	1.0	0.9	1.1	--	--	1.0
P00813_C75	--	1.0	--	1.2	--	--	--	--	--	0.9
O14933_C98	--	--	1.4	1.4	--	1.0	--	--	--	1.1
Q14790_C360	--	--	--	--	--	--	1.2	--	1.0	--
Q15306_C194	--	1.4	--	1.4	--	1.0	--	--	--	1.5
Q6L8Q7_C108	--	--	1.4	6.8	--	1.1	--	--	--	--
P48735_C308	--	--	1.1	--	0.5	--	--	--	1.0	--
Q86UV5_C39	--	1.8	0.9	--	--	--	--	--	1.0	--
P50851_C1704	--	1.1	--	1.1	--	--	--	--	--	--
O94953_C694	--	1.4	--	1.4	--	--	--	--	--	--
P19447_C342	1.4	--	1.0	--	--	--	--	--	1.2	--
Q00535_C157	--	1.0	--	--	1.2	0.8	--	--	1.1	--
Q9UPT9_C171	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.9
Q9HB90_C377	0.6	--	--	--	--	1.1	--	--	1.2	--
P50851_C2675	--	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9NYL2_C22	--	--	--	--	--	--	1.1	1.2	1.1	--
Q5T1V6_C414	--	--	--	--	0.8	--	--	--	1.0	1.0
Q9HB90_C358	--	--	--	--	--	0.6	--	--	1.0	1.0
P16455_C145	--	20.0	--	--	--	1.0	--	--	--	--
Q9Y5T5_C205	1.7	3.2	--	--	1.1	--	--	--	1.1	0.9
O00541_C272	--	--	--	--	--	--	--	1.0	1.1	--
Q02556_C306	--	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--
Q15910_C503	--	--	0.9	--	--	--	--	--	--	--
Q96RU2_C171	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q16877_C159	--	1.1	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C302	--	--	--	1.8	--	--	--	--	--	--

【０５７９】

【表１０－２】

識別子	51_500 uM_インビトロ_231	51_500 uM_インビトロ_ramos	52_500 uM_インビトロ_231	52_500 uM_インビトロ_ramos	53_500 uM_インビトロ_231	53_500 uM_インビトロ_ramos	54_500 uM_インビトロ_231	55_500 uM_インビトロ_231	56_500 uM_インビトロ_231	56_500 uM_インビトロ_ramos
Q96JH7_C219	--	2.3	--	1.6	--	--	--	--	--	1.0
P48200_C137	--	--	--	1.3	--	--	--	--	--	--
O00622_C39	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C453	--	1.8	--	--	--	--	--	--	--	--
P51617_C608	--	1.1	--	17.6	--	--	--	--	--	--
P42575_C370	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P09086_C346	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q09472_C1738	--	--	1.1	--	--	--	--	--	--	--
Q01201_C109	--	1.6	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C741	--	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P14598_C378	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0C9_C375	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C134	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C361	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P43403_C117	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96FA3_C282	--	--	--	20.0	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9Y4C1_C251	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q70CQ2_C1090	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O00622_C70	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P04150_C622	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５８０】

表２は、インサイツで実施されたｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験からのリガンド結合されたシステインおよび断片求電子ライブラリーを伴うそれらの反応性プロフィールのリストを示す。表２はさらにタンパク質の受入番号（またはタンパク質識別子）を示す。

【０５８１】

【表１１－１】
表２A

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
P04406_C152	GAPDH グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	16	20.0	1.6	1.1	1.7
P61978_C132	HNRNPK ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 K	768	5.0	3.8	4.2	1.4
Q13526_C113	PIN1 ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼ NIMA 相互作用 1	19	20.0	3.4	2.6	3.3
P24752_C119	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	22	2.6	3.0	5.5	3.8
P24752_C413	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	56	20.0	4.5	20.0	19.5
Q9NUY8_C283	TBC1D23 TBC1 ドメインファミリーメンバー 23	101	4.1	2.1	4.9	2.1
P13667_C206	PDIA4 タンパク質 ジスルフィド-イソメラーゼ A4	36	2.6	6.8	15.2	1.1
P12268_C140	IMPDH2 イソシン-5-一リン酸デヒドロゲナーゼ 2	45	1.3	1.0	0.9	1.2
Q15365_C194	PCBP1 ポリ(rC)結合タンパク質 1	29	5.1	1.4	1.4	10.1
Q9NVC6_C649	RNA ポリメラーゼ II 転写サブユニット 17 の MED17 メディエーター	211	7.7	1.7	3.2	2.2
P42166_C561	TMPO ラミナ関連のポリペプチド 2, アイソフォームアルファ	88	8.3	20.0	4.6	3.7
Q9Y696_C35	CLIC4 クロライド細胞内チャネルタンパク質 4	21	1.7	20.0	4.7	2.6
P10599_C32	TXN チオレドキシン	34	7.9	3.3	5.9	20.0
P31943_C267	HNRNPH1 ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 H	769	3.8	6.0	5.3	2.1
Q86SX6_C67	GLRX5 グルタレドキシン関連のタンパク質 5, ミトコンドリア	26	1.1	1.4	1.0	5.1
P15121_C299	AKR1B1 アルドースレダクターゼ	48	0.9	1.0	1.7	1.4
P52597_C267	HNRNPF ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 F	108	4.2	20.0	--	3.2
Q9ULV4_C420	CORO1C クロニン-1C	770	3.0	1.3	4.6	2.0
P62888_C92	RPL30 60S リボソームタンパク質 L30	100	1.0	2.7	1.5	1.3
Q9NQR4_C153	NIT2 オメガ-アミダーゼ NIT2	47	13.1	0.7	20.0	20.0
P42765_C92	ACAA2 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ, ミトコンドリア	71	20.0	3.7	20.0	4.3
Q15084_C55	PDIA6 タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A6	51	3.0	4.9	4.4	2.1
Q96HE7_C241	ERO1L ERO1 様タンパク質アルファ	61	2.4	3.0	3.7	--

【０５８２】

【表１１－２】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
Q99439_C164	CNN2 カルポニン-2	41	--	1.5	1.1	4.7
P25205_C119	MCM3 DNA 複製ライセンス化因子 MCM3	74	3.5	4.3	3.5	1.9
Q9NS86_C187	LANCL2 LanC 様タンパク質 2	203	--	1.6	6.1	2.5
Q15233_C145	NONO 非 POU ドメイン含有オクタマー結合タンパク質	72	--	1.6	12.0	1.4
Q9BRA2_C43	TXNDC17 チオレドキシンドメイン含有タンパク質 17	62	15.5	3.5	20.0	20.0
P35611_C68	ADD1 アルファ-アデュシン	771	5.8	4.3	2.4	4.3
O75521_C380	ECI2 エノイル-CoA デルタイソメラーゼ 2, ミトコンドリア	155	0.6	1.6	0.8	0.7
Q9BXW7_C392	CECR5 ネコ眼症候群棄却域タンパク質 5	772	3.6	2.2	3.2	1.5
P30101_C406	PDIA3 タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A3	773	3.2	9.0	20.0	1.4
Q96AB3_C114	ISOC2 イソコリスマターゼドメイン含有タンパク質 2, ミトコンドリア	159	1.6	0.8	4.7	--
P13667_C555	PDIA4 タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A4	774	3.2	9.0	20.0	1.4
Q09161_C44	NCBP1 キャップ結合タンパク質サブユニット 1	102	2.1	1.8	2.0	--
P78417_C32	GSTO1 グルタチオン S-トランスフェラーゼオメガ-1	32	--	19.9	20.0	--
Q9ULW0_C536	Xklp2 に対する TPX2 標的タンパク質	437	20.0	20.0	20.0	5.7
Q9NRG0_C55	CHRAC1 クロマチンアクセシビリティ複合タンパク質 1	252	20.0	20.0	7.4	2.9
Q96T76_C848	MMS19 MMS19 ヌクレオチド除去修復タンパク質 相同体	114	3.9	20.0	1.7	20.0
Q8TAQ2_C145	SMARCC2 SWI/SNF複合体サブユニット SMARCC2	775	4.6	3.1	--	--
Q9BVC5_C10	C2orf49 Ashwin	168	2.7	3.3	4.5	--
Q7Z2W4_C645	ZC3HAV1 ジンクフィンガー CCCH 型 抗ウイルスタンパク質 1	776	--	4.4	5.1	3.0
Q9BQ69_C186	MACROD1 O-アセチル-ADP-リボース脱アセチル化酵素 MACROD1	777	4.8	1.8	5.0	1.2
Q16831_C162	UPP1 ウリジンホスホリラーゼ 1	364	1.2	1.0	20.0	7.7
P30101_C57	PDIA3 タンパク質 ジスルフィド-イソメラーゼ A3	133	2.2	20.0	20.0	--
P12268_C331	IMPDH2 イソシン-5-一リン酸デヒドロゲナーゼ 2	144	12.1	4.6	--	1.3
O95571_C170	ETHE1 タンパク質 ETHE1, ミトコンドリア	176	3.8	2.3	6.8	2.0

【０５８３】

【表１１－３】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
O00299_C24	CLIC1 クロライド細胞内チャネル タンパク質 1	69	9.5	20.0	10.3	3.0
O14879_C343	テトラトリコペプチドを有する IFIT3 インターフェロン誘導タンパク質	308	7.6	6.6	2.1	17.2
Q96CM8_C64	ACSF2 アシル-CoA シンテターゼファミリーメンバー 2, ミトコンドリア	194	20.0	20.0	20.0	--
P51946_C244	CCNH サイクリン-H	778	1.9	5.3	--	--
P49588_C773	AARS アラニン--tRNA リガーゼ, 細胞質	122	--	1.3	1.5	1.5
Q96RN5_C618	RNA ポリメラーゼ II 転写サブユニットの MED15 メディエーター	171	6.4	4.5	20.0	--
O15294_C758	OGT UDP-N-アセチルグルコサミン--ペプチド N-アセチルグルコサミン	104	2.6	6.4	2.4	2.1
P46734_C207	MAP2K3 二重特異性マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ	184	0.8	0.6	0.8	3.3
Q96S55_C272	WRNIP1 ＡＴＰアーゼ WRNIP1	215	2.2	3.7	1.2	4.5
O95229_C54	ZWINT ZW10 相互作用物質	779	3.4	12.4	3.1	3.7
O60610_C1227	DIAPH1 タンパク質透明相同体 1	780	2.2	1.6	--	1.5
Q13428_C38	TCOF1 トリークルタンパク質	150	3.3	2.8	2.0	--
Q9Y277_C65	VDAC3 電位依存性アニオン選択的チャネルタンパク質	512	3.3	4.7	6.2	--
P57764_C268	GSDMD ガスダーミン-D	110	20.0	20.0	8.4	--
Q9Y3A3_C134	MOB4 MOB 様 タンパク質フォセイン	121	--	1.2	1.6	20.0
Q02252_C317	ALDH6A1 メチルマロン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	265	10.3	14.4	--	--
Q9NYL9_C132	TMOD3 トロポモジュリン-3	130	2.2	0.8	0.9	7.6
P83731_C6	RPL24 60S リボソーム タンパク質 L24	147	2.4	0.7	--	4.3
O95336_C32	PGLS 6-ホスホグルコノラクトナーゼ	55	14.9	--	20.0	6.7
Q13155_C291	AIMP2 アミノアシル tRNA シンターゼ複合体相互作用多機能タンパク質(multif)	83	20.0	20.0	2.4	1.9
Q13418_C346	ILK インテグリン結合 タンパク質 キナーゼ	149	1.4	0.8	--	2.7
A6NDU8_C179	C5orf51 UPF0600 タンパク質 C5orf51	298	4.2	3.0	--	20.0
Q9UKF6_C498	CPSF3 切断・ポリアデニル化特異的因子サブユニット(su)	118	6.2	3.5	20.0	--
Q96F86_C413	mRNA デキャッピング タンパク質 3 の EDC3 エンハンサー	141	20.0	20.0	--	--
P42224_	STAT1 シグナル伝達性転写因子 1	228	16.9	--	--	3.1

【０５８４】

【表１１－４】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
C492						
P11216_C326	PYGB グリコーゲンホスホリラーゼ, 脳型	366	--	1.7	20.0	2.6
P21980_C277	TGM2 タンパク質-グルタミンガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ 2	356	0.7	0.5	0.7	2.3
Q9HAV7_C124	GRPEL1 GrpE タンパク質相同体 1, ミトコンドリア	206	3.2	1.7	2.2	4.7
P24752_C126	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	89	9.1	2.8	4.5	14.1
Q9NQ88_C161	TIGAR フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ TIGAR	117	6.0	--	--	2.6
Q13155_C23	AIMP2 アミノアシル tRNA シンターゼ複合体相互作用多機能 1 タンパク質 2	132	--	2.8	2.7	--
Q9NQW6_C712	ANLN アクチン結合タンパク質アニリン	281	--	4.1	14.1	3.1
P51649_C340	ALDH5A1 コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ, ミトコンドリア	189	1.9	1.0	2.7	--
Q15021_C439	NCAPD2 コンデンシン複合体サブユニット 1	139	--	2.2	0.6	6.1
Q5T0N5_C69	FNBP1L フォルミン結合タンパク質 1 様	418	20.0	20.0	3.6	--
P38606_C138	ATP6V1A V 型プロトンＡＴＰアーゼ触媒サブユニット A	201	--	20.0	20.0	20.0
Q9HCC0_C216	MCCC2 メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼベータ鎖, ミトコンドリア (mitoch)	363	4.6	5.9	3.9	--
Q9NQC3_C1101	RTN4 レチクロン-4	247	12.0	20.0	--	20.0
P35754_C23	GLRX グルタレドキシン-1	142	--	20.0	--	--
Q99757_C90	TXN2 チオレドキシン, ミトコンドリア	208	10.1	3.6	4.5	20.0
Q9Y3D0_C93	FAM96B 紡錘体関連の MMXD 複合体サブユニット MIP18	179	20.0	20.0	--	--
Q9UMS0_C213	NFU1 NFU1 鉄-硫黄クラスター足場相同体, ミトコンドリア	394	7.4	4.4	--	--
Q9NXV6_C516	CDKN2AIP CDKN2A 相互作用タンパク質	255	20.0	--	--	6.6
Q96RS6_C376	NUDCD1 NudC ドメイン含有タンパク質 1	79	--	1.6	--	2.2
Q14997_C1840	PSME4 プロテアソーム活性化因子複合体サブユニット 4	257	2.8	20.0	20.0	--
P50570_C27	DNM2 ダイナミン-2	73	4.6	2.2	--	--
Q86YH6_C71	PDSS2 デカプレニル二リン酸シンターゼサブユニット 2	401	20.0	20.0	--	--
Q99497_C106	PARK7 タンパク質 DJ-1	109	--	0.9	--	--

【０５８５】

【表１１－５】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
Q9UJW0_C258	DCTN4 Dyn アクチンサブユニット 4	103	4.0	--	20.0	--
Q9BUH6_C180	C9orf142 特徴づけられていないタンパク質 C9orf142	348	--	1.2	6.6	2.8
P24752_C196	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	33	20.0	3.5	--	5.8
Q13162_C51	PRDX4 ペルオキシレドキシン-4	781	4.6	1.2	1.4	3.3
Q9BTA9_C553	コイルドコイルを有する WAC WW ドメイン含有アダプタータンパク質	153	17.6	17.8	9.6	--
P48643_C253	CCT5 T-複合タンパク質 1 サブユニット イプシロン	126	--	0.8	0.8	--
O75362_C286	ZNF217 ジンクフィンガー タンパク質 217	268	8.9	--	--	--
O60825_C158	PFKFB2 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ	272	0.7	--	--	--
Q8NBS9_C350	TXNDC5 チオレドキシン ドメイン含有タンパク質 5	136	--	2.4	--	1.7
Q9NYL2_C22	MLTK マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ キナーゼ キナーゼ MLTK	430	5.5	20.0	1.4	10.3
P27707_C9	DCK デオキシシチジンキナーゼ	93	--	1.4	--	4.9
Q93009_C223	USP7 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7	782	--	6.8	20.0	--
O14929_C101	HAT1 ヒストンアセチルトランスフェラーゼB 型触媒サブユニット	154	--	--	--	9.0
Q9UPQ0_C140	LIMCH1 LIM および カルポニン相同体ドメイン含有タンパク質	783	20.0	--	20.0	--
Q96NY7_C487	CLIC6 クロライド細胞内チャネルタンパク質 6	447	--	20.0	5.1	3.6
Q9NQ88_C114	TIGAR フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ TIGAR	143	2.8	--	--	1.9
Q14790_C360	CASP8 カスパーゼ-8	335	20.0	20.0	--	--
P04183_C230	TK1 チミジンキナーゼ, 細胞質ゾル	784	1.9	0.8	--	10.0
P68366_C54	TUBA4A チューブリンアルファ-4A 鎖	137	9.7	0.8	0.9	--
Q13428_C1298	TCOF1 トリークルタンパク質	785	4.7	5.6	20.0	--
Q5MNZ6_C63	WDR45L WD リピートドメインホスホイノシチド相互作用タンパク質	434	--	2.0	20.0	--
O14980_C528	XPO1 エキスポーチン-1	786	20.0	1.9	--	--
Q86W42_C35	THOC6 THO 複合体サブユニット 6 相同体	217	--	--	--	20.0
Q9Y6G9	DYNC1LI1 細胞質ダイニン 1 軽中間鎖 1	107	--	3.5	4.1	--

【０５８６】

【表１１－６】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
_C51						
Q9NY27_C22	PPP4R2 セリン/トレオニン-プロテインフォスファターゼ 4 制御性	282	20.0	20.0	--	--
Q8NFH5_C255	NUP35 ヌクレオポリン NUP53	386	5.1	3.9	--	--
Q9Y676_C128	MRPS18B 28S リボソームタンパク質 S18b, ミトコンドリア	495	10.2	2.3	1.0	--
P35658_C728	NUP214 核膜孔複合体タンパク質 Nup214	311	3.9	1.7	--	--
Q9NTX5_C133	ECHDC1 エチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼ	532	1.5	1.7	2.0	--
Q15118_C71	PDK1	623	20.0	20.0	20.0	--
Q00765_C18	REEP5 受容体発現増強タンパク質 5	344	--	20.0	2.7	--
P22307_C71	SCP2 非特異的脂質輸送タンパク質	787	3.2	2.7	20.0	--
O75521_C312	ECI2 エノイル-CoA デルタ イソメラーゼ 2, ミトコンドリア	788	0.7	1.0	0.5	0.5
P49189_C288	ALDH9A1 4-トリメチルアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	236	--	--	--	20.0
Q5T440_C170	IBA57 推定トランスフェラーゼ CAF17, ミトコンドリア	608	14.0	1.5	--	--
Q15084_C190	PDIA6 タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A6	96	--	20.0	5.2	--
Q96C19_C172	EFHD2 EF-ハンド(hand)ドメイン含有タンパク質 D2	246	--	5.3	--	2.8
P22061_C102	PCMT1 タンパク質-L-イソアスパラギン酸(D-アスパラギン酸塩) O-メチルトランスフェラーゼ	163	--	2.8	4.5	1.2
Q9NP73_C86	ALG13 UDP-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼサブユニット ALG13	528	20.0	20.0	--	--
Q9BRF8_C54	CPPED1 カルシニューリン様 ホスホエステラーゼドメイン含有	239	--	20.0	--	2.4
Q6ICB0_C108	DESI1 脱ＳUMO化イソペプチダーゼ 1	197	20.0	--	20.0	--
P29590_C389	PML タンパク質 PML	304	15.6	--	--	--
P07858_C211	CTSB カテプシン B	323	--	2.3	--	5.0
Q9NX18_C83	SDHAF2 コハク酸デヒドロゲナーゼ会合因子 2, ミトコンドリア	658	3.1	3.0	--	--
P46109_C249	CRKL Crk 様 タンパク質 VPCAYDK K.RVPC*AYDK.T	99	20.0	--	--	6.7
P45984_C177	MAPK9 マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 9	302	--	12.0	20.0	--
P19447_	ERCC3 TFIIH 基本転写因子複合体ヘリカ	402	--	--	12.4	--

【０５８７】

【表１１－７】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
C342	ーゼ					
P42166_C341	TMPO ラミナ関連のポリペプチド 2, アイソフォームアルファ	175	10.4	--	4.4	--
Q8N1F7_C522	NUP93 核膜孔複合体タンパク質 Nup93	275	--	--	20.0	--
Q86UY8_C276	NT5DC3 5-ヌクレオチダーゼドメイン含有タンパク質 3	789	3.8	--	--	--
Q8WWI1_C228	LMO7 LIM ドメインのみのタンパク質 7	504	--	--	--	--
Q9NWA0_C139	RNA ポリメラーゼ II 転写サブユニットのMED9メディエーター	654	4.3	3.4	--	--
P09110_C381	ACAA1 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ, ペルオキシゾーム	205	--	--	0.8	--
Q2NL82_C126	TSR1 Pre-rRNA プロセシングタンパク質 TSR1 相同体	233	20.0	13.8	--	--
Q5JPI3_C308	C3orf38 特徴づけられていないタンパク質 C3orf38	544	2.9	--	--	--
P23919_C163	DTYMK チミジル酸キナーゼ	173	--	0.4	0.6	--
Q96EB1_C218	ELP4 エロンゲーター複合タンパク質 4	466	--	20.0	--	8.4
Q96FX7_C209	TRMT61A tRNA (アデニン(58)-N(1))-メチルトランスフェラーゼ触媒性	313	20.0	2.4	--	--
O14933_C98	UBE2L6 ユビキチン/ISG15 結合酵素 E2 L6	331	--	3.0	--	--
Q29RF7_C242	PDS5A 姉妹染色分体接着タンパク質 PDS5 相同体 A	232	--	3.0	1.0	--
Q96T76_C819	MMS19 MMS19 ヌクレオチド除去修復タンパク質相同体	181	--	--	--	--
P23919_C117	DTYMK チミジル酸 キナーゼ	267	--	--	0.4	7.3
Q15149_C4574	PLEC プレクチン	336	--	4.2	--	0.8
Q96RP9_C153	GFM1 転写伸長因子 G, ミトコンドリア	524	--	1.0	--	--
P04818_C199	TYMS チミジル酸シンターゼ	406	20.0	20.0	--	--
P27708_C73	CAD CAD タンパク質	191	3.1	--	20.0	--
P55265_C1224	ADAR 二本鎖 RNA-特異的アデノシンデアミナーゼ	359	9.1	--	--	--
Q9Y3D2_C105	MSRB2 メチオニン-R-スルホキシドレダクターゼ B2, ミトコンドリア	403	--	20.0	20.0	--
O00244_C12	ATOX1 銅輸送タンパク質 ATOX1	365	--	--	--	4.7
Q8WV74_C207	NUDT8 ヌクレオシド二リン酸結合部分 Xモチーフ 8, ミトコンドリア	468	20.0	20.0	20.0	--
Q9NRW3_C130	APOBEC3C 高可能性 DNA dC- dU 編集	358	20.0	20.0	--	--

【０５８８】

【表１１－８】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
	酵素 APOBEC-3C					
P24468_C326	NR2F2 COUP 転写因子 2	790	20.0	20.0	20.0	--
P42166_C684	TMPO ラミナ関連のポリペプチド 2, アイソフォームアルファ	312	--	--	4.6	--
Q96EY5_C231	FAM125A 多胞体サブユニット 12A	540	4.1	1.7	--	1.9
P14635_C238	CCNB1 G2/有系分裂特異的サイクリン-B1	448	--	--	--	3.7
Q8NDH3_C81	NPEPL1 高可能性アミノペプチダーゼ NPEPL1	791	20.0	20.0	20.0	--
Q9P0J1_C149	PDP1	276	20.0	--	--	--
Q96P48_C900	Rho-GAP ドメインを有する ARAP1 Arf-GAP, ANK リピートおよび PH ドメイン	433	5.5	--	--	--
Q96HE7_C37	ERO1L ERO1 様タンパク質アルファ	347	--	5.4	--	20.0
Q07065_C100	CKAP4 細胞骨格関連のタンパク質 4	733	--	--	--	15.4
Q9BRJ7_C88	NUDT16L1 タンパク質 syndesmos	432	20.0	20.0	--	--
O75439_C265	PMPCB ミトコンドリアプロセシング ペプチダーゼ サブユニット ベータ	320	--	--	--	--
O43175_C369	PHGDH D-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ	248	20.0	--	--	--
Q9UNI6_C265	DUSP12 二重特異性 プロテインフォスファターゼ 12	241	--	0.8	--	--
Q06203_C100	PPAT アミドホスホリボシル トランスフェラーゼ	188	--	1.7	--	--
A0AVT1_C347	UBA6 ユビキチン様修飾酵素活性化酵素 6	158	--	20.0	--	3.3
Q86X76_C203	NIT1 ニトリラーゼ相同体 1	471	--	0.7	--	--
Q6XZF7_C691	DNMBP ダイナミン結合タンパク質	353	--	1.2	--	3.4
Q15398_C129	DLGAP5 Disks large 関連のタンパク質 5	167	20.0	--	--	--
O75717_C773	WDHD1 WD リピートおよび HMG-ボックス DNA 結合タンパク質 1	289	--	--	4.2	--
Q01433_C107	AMPD2 AMP デアミナーゼ 2	259	4.4	2.3	6.2	3.1
Q8WVV9_C464	HNRPLL ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 L 様	487	--	--	--	--
O14733_C131	MAP2K7 二重特異性マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ	427	--	--	--	--
Q14137_C404	BOP1 リボソーム形成タンパク質 BOP1	535	20.0	1.2	--	--
Q96RU2_C171	USP28 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 28	569	--	20.0	1.2	--

【０５８９】

【表１１－９】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
Q9Y679_C391	AUP1 Ancient ubiquitous タンパク質 1	564	--	20.0	20.0	--
P51610_C1872	HCFC1 宿主細胞因子 1	270	4.1	--	--	--
P22307_C307	SCP2 非特異的脂質輸送タンパク質	541	20.0	20.0	20.0	--
Q9BTE3_C325	MCMBP ミニ染色体維持複合結合タンパク質	792	--	--	--	--
Q9HA64_C24	FN3KRP ケトサミン-3-キナーゼ	106	6.3	20.0	--	20.0
Q5TFE4_C119	NT5DC1 5-ヌクレオチダーゼドメイン含有タンパク質 1	75	--	--	--	20.0
Q96N67_C2125	DOCK7細胞質分裂タンパク質のデディケイター7	408	--	4.1	5.4	--
P52948_C1312	NUP98 核膜孔複合タンパク質 Nup98-Nup96	575	--	--	--	--
Q5UIP0_C2298	RIF1テロメア関連のタンパク質 RIF1	607	--	20.0	--	--
P51812_C436	RPS6KA3 リボソームタンパク質 S6 キナーゼアルファ-3	662	--	--	--	2.1
Q92616_C1692	GCN1L1 翻訳活性化因子 GCN1	174	1.4	--	--	--
Q15345_C297	LRRC41ロイシンリッチリピート含有タンパク質 41	536	--	--	--	--
Q9NPH0_C267	ACP6リゾフォスファチジン酸ホスファターゼ 6 型	329	--	20.0	20.0	--
P04183_C66	TK1 チミジンキナーゼ, 細胞質ゾル	138	--	--	2.3	7.0
P42166_C629	TMPO ラミナ関連のポリペプチド 2, アイソフォームアルファ	793	4.4	--	1.7	--
Q15013_C124	MAD2L1BP MAD2L1 結合タンパク質	794	--	13.0	5.4	--
Q9Y5Y2_C72	NUBP2 細胞質ゾル Fe-S クラスター会合因子 NUBP2	795	5.3	--	--	4.0
O15446_C86	CD3EAP DNA 指向性 RNA ポリメラーゼ I サブユニット RPA34	796	3.9	--	--	--
Q13630_C116	TSTA3 GDP-L-フコースシンターゼ	797	20.0	--	--	1.9
Q8IYQ7_C324	THNSL1 トレオニン シンターゼ様 1	628	--	--	20.0	1.6
P05091_C319	ALDH2 アルデヒドデヒドロゲナーゼ, ミトコンドリア	318	--	20.0	--	--
Q29RF7_C532	PDS5A 姉妹染色分体接着タンパク質 PDS5 相同体 A	261	--	20.0	--	--
Q9Y570_C381	PPME1 プロテインフォスファターゼメチルエステラーゼ 1	578	12.6	1.1	--	20.0
Q14980_C961	NUMA1 核有糸分裂装置タンパク質 1	429	--	--	--	--
P53384_	NUBP1 細胞質ゾル Fe-S クラスター会合	552	--	0.6	0.6	6.8

【０５９０】

【表１１－１０】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
C235	因子 NUBP1					
Q15003_C418	NCAPH コンデンシン複合体サブユニット 2	258	20.0	20.0	--	--
P53634_C258	CTSC ジペプチジルペプチダーゼ 1	798	0.9	1.2	--	--
Q8NFF5_C499	FLAD1 FAD シンターゼ	750	6.2	--	--	--
Q9ULA0_C144	DNPEP アスパルチルアミノペプチダーゼ	134	--	--	--	2.1
P22307_C94	SCP2 非特異的脂質輸送タンパク質	559	--	20.0	--	--
O15294_C620	OGT UDP-N-アセチルグルコサミン--ペプチド N-アセチルグルコサミン	279	--	20.0	--	--
Q9Y5S2_C1517	CDC42BPB セリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ MRCK ベータ	554	20.0	20.0	--	--
Q8TD19_C623	NEK9 セリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ Nek9	393	--	--	--	--
Q8N2W9_C326	PIAS4 E3 SUMO-タンパク質リガーゼ PIAS4	625	--	--	--	--
Q13158_C98	FADD タンパク質 FADD	799	20.0	--	--	--
Q9UKX7_C151	NUP50 核膜孔複合タンパク質 Nup50	234	6.1	--	--	--
Q6PCB5_C280	RSBN1L円形精子細胞塩基性タンパク質 1 様タンパク質	519	--	--	--	--
P10398_C597	ARAF セリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ A-Raf	505	--	--	--	5.0
Q9UL40_C68	ZNF346 ジンクフィンガー タンパク質 346	706	--	--	--	--
P46013_C903	MKI67 抗原 KI-67	595	20.0	--	--	--
Q16667_C39	CDKN3 サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 3	482	--	0.6	--	--
O75150_C890	RNF40 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ BRE1B	405	--	--	--	--
Q00610_C870	CLTCクラスリン重鎖 1	113	--	2.1	--	2.8
Q9Y5T5_C205	USP16 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 16	474	7.9	20.0	--	--
O95881_C66	TXNDC12 チオレドキシン ドメイン含有タンパク質 12	342	--	--	--	--
Q7Z5K2_C160	WAPAL Wings apart 様タンパク質相同体	800	20.0	--	--	--
P42166_C518	TMPO ラミナ関連のポリペプチド 2, アイソフォームアルファ	801	--	--	--	3.4
Q9Y2S7_C143	POLDIP2 ポリメラーゼデルタ相互作用タンパク質 2	574	--	--	--	2.3
E2QRD5_C183	C15orf38-AP3S2 タンパク質 C15orf38-	581	--	--	--	4.9

【０５９１】

【表１１－１１】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
	AP3S2					
O95833_C22	CLIC3 クロライド細胞内チャネルタンパク質 3	531	--	--	--	20.0
O94953_C694	KDM4B リジン特異的デメチラーゼ 4B	395	20.0	--	--	--
O00541_C272	PES1 Pescadillo 相同体	511	--	--	--	5.0
Q9NXJ5_C149	PGPEP1 ピログルタミル-ペプチダーゼ 1	587	--	20.0	--	--
Q8N5L8_C131	RPP25L リボヌクレアーゼ P タンパク質サブユニット p25 様タンパク質	670	--	--	--	--
Q8IZ73_C246	RPUSD2 RNAプソイドウリジンシンターゼドメイン含有タンパク質	441	--	--	--	--
Q99798_C385	ACO2 アコニット酸ヒドラターゼ, ミトコンドリア	685	20.0	1.0	--	--
Q9GZR2_C382	REXO4 RNAエキソヌクレアーゼ4	621	--	--	--	--
Q13613_C117	MTMR1 ミオチューブラリン関連のタンパク質 1	717	--	--	--	--
Q9NUI1_C22	DECR2 ペルオキシゾーム 2,4-ジエノイル-CoA レダクターゼ	698	--	--	--	--
Q02556_C306	IRF8 インターフェロン調節因子 8	513	--	--	--	--
Q9UPT9_C171	USP22 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 22	802	--	--	--	--
Q8N999_C302	C12orf29 特徴づけられていないタンパク質 C12orf29	484	--	--	--	--
Q8IU81_C363	IRF2BP1 インターフェロン調節因子 2 結合タンパク質 1	803	--	--	--	--
Q9C0I1_C152	MTMR12 ミオチューブラリン関連のタンパク質 12	671	--	--	--	--
Q9P2X3_C195	IMPACT タンパク質 IMPACT	678	--	20.0	--	--
Q6QNY0_C168	BLOC1S3 リソソーム関連オルガネラ複合体の形成	411	--	--	--	--
Q15796_C81	SMAD2 マザーズ・アゲインスト・デカペンタプレジック相同体 2	561	20.0	--	--	--
Q9NZB2_C531	PPAR ガンマ様タンパク質の FAM120A 構成的コアクチベーター	492	--	--	--	--
Q9HB90_C377	RRAGC Ras 関連 GTP 結合タンパク質 C	417	3.3	--	--	4.3
Q9BR61_C267	ACBD6 アシル-CoA 結合ドメイン含有タンパク質 6	472	--	--	--	--
P16455_C145	MGMT メチル化-DNA--タンパク質-システインメチルトランスフェラーゼ	470	--	--	--	--
Q86UV5_C39	USP48 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 48	381	20.0	--	--	--

【０５９２】

【表１１－１２】

識別子	タンパク質	SEQ ID NO:	2_200 uM_インサイツ_231	4_100 uM_インサイツ_231	8_200 uM_インサイツ_231	9_200 uM_インサイツ_231
A2A288_C367	ZC3H12D 高可能性リボヌクレアーゼ ZC3H12D	515	--	--	--	--
Q8NEC7_C140	GSTCD グルタチオン S-トランスフェラーゼ C 末端ドメイン含有タンパク質	602	--	--	--	--
Q6PJG6_C673	BRAT1 BRCA1 関連の ATM 活性化因子 1	695	--	--	--	--
Q13232_C158	NME3ヌクレオシド二リン酸キナーゼ 3	653	--	--	--	2.7
Q86X76_C165	NIT1 ニトリラーゼ相同体 1	345	--	0.9	--	--
P42695_C541	NCAPD3 コンデンシン-2 複合体サブユニット D3	573	--	--	--	--
P41226_C599	UBA7 ユビキチン様修飾酵素活性化酵素 7	702	--	--	--	--
Q99986_C50	VRK1 セリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ VRK1	497	--	--	--	--
Q8WUM4_C90	PDCD6IP プログラム細胞死 6相互作用タンパク質	527	--	--	--	--
P29590_C213	PML タンパク質 PML	477	--	--	--	--
Q9P0K7_C973	RAI14 Ankycorbin	638	--	8.7	--	--
P53992_C78	SEC24C タンパク質輸送タンパク質 Sec24C	498	--	--	5.4	--
Q13867_C73	BLMHブレオマイシンヒドロラーゼ	431	--	--	--	3.9
Q8ND24_C655	RNF214 RING フィンガータンパク質 214	451	6.5	--	--	4.0
Q96EK4_C48	THAP11 THAP ドメイン含有タンパク質 11	538	7.9	--	--	--
Q96IV0_C309	NGLY1 ペプチド-N(4)-(N-アセチル-ベータ-グルコサミニル)アスパラギン	660	--	--	--	--
Q5T1V6_C414	DDX59 高可能性 ATP依存性RNA ヘリカーゼ DDX59	439	--	--	--	--
Q9UHQ1_C99	NARF 核プレラミン A 認識因子	740	--	--	--	--
O43396_C34	TXNL1 チオレドキシン様タンパク質 1	310	--	--	--	--
Q8IV53_C174	DENND1C DENN ドメイン含有タンパク質 1C	804	--	--	--	--
Q8N9T8_C673	KRI1 タンパク質 KRI1 相同体	563	--	--	5.3	--

【０５９３】

【表１２－１】
表2B

識別子	9_200uM_インサイツ_ramos	10_200uM_インサイツ_231	10_200uM_インサイツ_ramos	11_100uM_インサイツ_231	12_200uM_インサイツ_231	13_200uM_インサイツ_231	13_200uM_インサイツ_ramos	14_200uM_インサイツ_231	14_200uM_インサイツ_ramos	21_200uM_インサイツ_231
P04406_C152	1.1	1.0	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	1.3
P61978_C132	1.4	5.6	1.6	0.9	7.5	1.1	1.1	1.3	0.9	1.4
Q13526_C113	1.3	2.0	1.3	0.7	0.6	0.9	1.0	0.8	1.0	0.7
P24752_C119	4.3	4.5	1.5	1.2	4.1	2.1	2.8	1.0	--	1.6
P24752_C413	20.0	7.8	2.2	1.2	9.9	3.5	20.0	0.9	0.8	1.5
Q9NUY8_C283	1.5	2.0	--	1.1	2.9	1.1	1.1	0.8	0.6	0.8
P13667_C206	1.4	3.8	--	4.1	16.6	1.1	--	1.0	0.7	0.8
P12268_C140	1.1	0.7	0.9	0.6	1.2	0.7	--	10.3	--	0.6
Q15365_C194	1.5	1.6	2.0	0.4	1.3	0.9	1.4	1.0	--	1.1
Q9NVC6_C649	1.3	2.3	2.1	0.8	4.0	1.1	1.0	1.0	1.4	0.8
P42166_C561	2.1	17.8	--	0.6	16.1	1.2	1.0	2.9	--	1.4
Q9Y696_C35	1.6	2.7	1.6	1.9	20.0	2.3	3.2	0.7	--	1.1
P10599_C32	2.1	3.8	--	13.0	20.0	7.9	4.1	3.1	--	3.9
P31943_C267	1.5	4.8	2.5	0.9	5.0	1.1	1.2	1.3	--	1.5
Q86SX6_C67	14.0	1.3	1.1	1.4	1.6	10.3	12.4	3.1	--	1.4
P15121_C299	1.5	20.0	--	0.7	0.7	--	0.8	0.9	--	2.7
P52597_C267	1.6	2.5	2.4	1.0	6.8	1.2	1.3	1.5	--	1.5
Q9ULV4_C420	1.4	3.4	--	0.9	2.2	1.1	1.1	1.4	--	1.3
P62888_C92	2.4	1.3	4.5	0.8	1.1	0.8	2.0	1.0	--	0.9
Q9NQR4_C153	20.0	20.0	--	3.7	0.9	6.2	12.2	0.8	--	0.9
P42765_C92	1.2	3.7	1.1	--	20.0	--	2.2	1.2	0.8	1.3
Q15084_C55	1.4	3.1	--	4.3	15.4	--	1.5	1.0	--	0.9
Q96HE7_C241	1.8	2.0	--	1.8	16.4	1.5	1.3	1.1	--	1.6
Q99439_C164	1.3	1.2	1.3	0.6	0.9	0.9	1.3	0.9	--	0.9
P25205_C119	1.8	2.3	--	0.7	1.0	1.1	1.3	1.2	--	1.1
Q9NS86_C187	1.7	6.3	--	0.8	2.0	1.0	1.1	1.0	3.3	0.9
Q15233_C145	1.4	--	2.2	1.2	2.4	1.0	1.1	1.0	--	--
Q9BRA2_C43	5.4	20.0	--	17.7	20.0	20.0	5.2	1.4	--	16.0
P35611_C68	2.3	1.9	--	0.9	3.6	1.1	1.0	1.6	--	0.8
O75521_C380	1.1	4.8	--	0.8	1.9	1.0	--	1.1	--	1.8
Q9BXW7_C392	--	20.0	--	1.1	5.1	2.0	--	1.6	1.1	1.6
P30101_C406	1.6	3.3	1.4	--	20.0	--	2.0	1.1	--	--
Q96AB3_C114	3.7	20.0	--	0.9	1.6	2.4	--	1.0	--	4.9
P13667_C555	1.6	3.3	1.4	--	20.0	--	2.0	1.1	--	--
Q09161_C44	1.4	12.4	--	1.1	4.7	1.0	--	2.0	--	1.3
P78417_C32	20.0	20.0	20.0	--	20.0	20.0	20.0	1.7	--	--
Q9ULW0_C536	1.6	17.6	--	1.4	20.0	1.5	--	1.5	--	0.9
Q9NRG0_C55	2.5	2.7	--	1.1	20.0	1.2	--	1.7	--	--
Q96T76_C848	1.8	2.5	--	--	20.0	0.6	1.5	5.0	20.0	0.7
Q8TAQ2_C145	2.4	--	20.0	7.6	--	1.1	--	1.3	--	1.6
Q9BVC5_C10	1.4	3.1	--	1.1	2.9	1.6	--	1.2	--	1.5
Q7Z2W4_C645	1.3	3.8	--	1.0	3.3	1.3	0.9	1.4	--	0.9
Q9BQ69_C186	--	2.4	--	1.0	2.7	1.4	--	1.1	--	1.4
Q16831_C162	--	7.3	--	0.8	0.9	1.0	--	0.6	--	1.6
P30101_C57	1.5	3.3	--	2.2	20.0	--	1.6	1.0	--	1.0
P12268_C331	2.6	--	2.1	1.0	--	--	1.4	1.7	--	0.8
O95571_C170	1.8	9.0	--	1.2	6.3	1.2	1.9	1.0	--	1.7
O00299_C24	1.4	5.0	--	2.5	20.0	--	1.8	0.8	--	0.7

【０５９４】

【表１２－２】

O14879_C343	--	4.9	--	0.4	3.5	1.0	--	1.5	--	0.8
Q96CM8_C64	20.0	20.0	--	1.5	17.9	1.4	--	1.5	--	2.0
P51946_C244	2.0	1.7	--	1.3	1.3	1.0	1.2	1.6	--	1.4
P49588_C773	2.0	2.1	1.7	0.9	0.9	0.8	1.1	1.0	--	1.1
Q96RN5_C618	--	--	--	1.0	20.0	1.0	1.4	1.6	--	1.0
O15294_C758	--	2.3	--	1.0	20.0	1.0	--	1.6	2.9	1.1
P46734_C207	1.8	0.8	--	0.6	0.7	0.8	--	13.8	--	0.9
Q96S55_C272	2.5	1.2	--	--	2.4	0.7	--	1.4	--	1.3
O95229_C54	--	2.3	--	1.2	20.0	0.8	1.4	5.0	20.0	0.8
O60610_C1227	--	1.5	1.4	0.9	0.8	0.7	0.9	--	--	20.0
Q13428_C38	1.7	4.2	--	1.1	4.7	1.6	--	3.6	--	1.5
Q9Y277_C65	0.8	3.3	2.5	1.4	3.9	1.0	--	1.7	--	2.9
P57764_C268	4.9	--	2.2	0.7	--	--	1.5	1.6	--	0.7
Q9Y3A3_C134	20.0	1.9	--	1.8	1.4	--	1.9	1.1	--	--
Q02252_C317	2.6	1.5	0.7	0.9	3.2	1.3	--	1.1	--	1.5
Q9NYL9_C132	--	--	--	0.5	0.6	--	--	0.5	--	1.4
P83731_C6	1.3	0.4	2.0	0.5	0.3	0.7	1.0	--	--	1.0
O95336_C32	2.6	--	--	0.9	20.0	1.6	2.2	3.2	--	0.9
Q13155_C291	--	1.7	--	0.9	1.1	--	--	1.6	--	0.8
Q13418_C346	--	1.1	8.3	0.6	0.6	0.7	2.1	0.8	--	0.5
A6NDU8_C179	3.7	1.3	--	0.7	--	0.8	--	1.9	--	0.9
Q9UKF6_C498	1.7	20.0	2.8	1.3	4.1	--	1.4	1.9	--	1.4
Q96F86_C413	4.0	20.0	20.0	20.0	--	1.6	2.0	1.0	--	0.8
P42224_C492	--	20.0	--	0.7	1.0	1.0	--	20.0	--	0.7
P11216_C326	--	8.6	--	0.8	3.9	1.3	--	0.8	--	0.9
P21980_C277	--	0.6	--	0.6	0.3	0.8	--	20.0	--	0.7
Q9HAV7_C124	3.8	1.0	--	0.9	1.1	--	--	1.3	--	1.7
P24752_C126	20.0	5.9	--	1.2	5.8	--	--	0.9	--	1.4
Q9NQ88_C161	2.0	4.6	2.1	0.9	--	1.1	1.5	20.0	--	1.0
Q13155_C23	1.6	2.3	--	1.2	1.6	0.9	--	1.1	--	0.9
Q9NQW6_C712	--	11.2	--	0.9	16.7	1.3	--	2.1	--	--
P51649_C340	1.5	13.4	20.0	--	20.0	1.1	1.3	0.7	--	1.2
Q15021_C439	--	5.2	--	0.9	6.7	--	--	5.9	--	0.7
Q5T0N5_C69	--	2.0	--	1.3	20.0	1.0	--	1.5	--	0.8
P38606_C138	--	20.0	--	9.2	20.0	20.0	--	1.9	--	20.0
Q9HCC0_C216	3.3	2.3	--	1.9	20.0	--	1.8	1.0	--	2.2
Q9NQC3_C1101	20.0	20.0	--	1.1	20.0	--	--	20.0	--	2.1
P35754_C23	5.7	--	13.0	20.0	20.0	--	--	0.7	--	--
Q99757_C90	--	--	--	2.7	5.0	--	--	3.2	--	4.3
Q9Y3D0_C93	2.1	2.1	--	0.9	--	--	1.4	2.7	--	0.5
Q9UMS0_C213	--	20.0	--	--	20.0	1.6	--	3.5	--	--
Q9NXV6_C516	13.8	7.7	--	1.0	3.3	2.4	1.6	1.4	--	0.8
Q96RS6_C376	1.7	5.7	--	0.8	1.1	0.7	1.2	0.9	1.8	1.4
Q14997_C1840	--	20.0	--	--	20.0	0.9	1.6	--	20.0	1.0
P50570_C27	1.4	3.1	--	0.7	0.7	--	1.0	1.0	--	0.8
Q86YH6_C71	6.6	20.0	--	1.0	20.0	1.2	1.8	20.0	--	2.1
Q99497_C106	2.6	1.7	--	1.3	3.0	--	3.3	0.8	--	--
Q9UJW0_C258	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	--	1.9	3.0	--	--
Q9BUH6_C180	--	3.8	--	--	1.4	1.1	--	1.3	--	--
P24752_C196	6.8	5.1	2.3	1.1	4.6	--	--	1.0	--	1.5
Q13162_C51	--	2.0	--	0.9	1.0	--	--	0.9	--	1.7
Q9BTA9_C553	2.1	20.0	--	1.7	--	1.4	--	1.7	--	2.8
P48643_C253	1.1	--	0.9	0.6	5.1	--	--	0.8	--	--
O75362_C286	1.8	2.6	--	1.0	20.0	1.1	20.0	1.4	--	1.1
O60825_C158	1.8	0.7	1.2	--	0.8	--	0.9	1.5	14.2	1.4

【０５９５】

【表１２－３】

Q8NBS9_C350	1.8	--	1.4	3.4	9.4	1.3	--	1.0	--	--
Q9NYL2_C22	--	1.2	--	0.7	0.7	1.3	--	0.9	--	--
P27707_C9	1.5	1.9	1.7	0.5	1.4	1.0	1.3	--	--	1.3
Q93009_C223	20.0	2.5	--	1.0	3.1	--	1.3	1.1	--	1.8
O14929_C101	--	20.0	--	0.8	20.0	0.9	1.2	1.6	1.9	1.2
Q9UPQ0_C140	--	3.9	--	1.0	1.9	1.1	--	4.6	--	0.8
Q96NY7_C487	--	3.2	--	3.1	20.0	1.9	--	0.8	--	1.2
Q9NQ88_C114	1.4	2.1	--	0.8	--	1.1	1.2	2.2	5.1	0.9
Q14790_C360	3.2	--	5.8	--	--	1.2	--	--	--	0.9
P04183_C230	2.0	1.3	--	--	--	0.7	--	--	--	0.7
P68366_C54	1.8	7.9	2.8	0.3	--	--	1.3	--	5.1	0.8
Q13428_C1298	2.5	5.9	--	0.8	20.0	--	--	3.0	--	--
Q5MNZ6_C63	11.2	3.6	--	0.9	20.0	1.1	--	1.2	--	0.8
O14980_C528	1.8	1.3	0.7	0.7	--	1.1	1.1	20.0	--	0.8
Q86W42_C35	2.7	--	--	1.3	--	--	--	0.9	--	--
Q9Y6G9_C51	--	4.9	--	--	6.5	--	1.5	2.1	4.3	0.6
Q9NY27_C22	1.8	--	2.1	2.3	20.0	--	1.5	1.3	--	--
Q8NFH5_C255	1.9	3.5	--	1.3	12.4	1.5	--	1.0	--	1.8
Q9Y676_C128	1.3	2.9	--	0.8	1.4	--	--	1.2	--	1.5
P35658_C728	4.2	20.0	--	0.8	--	1.0	--	1.2	--	1.3
Q9NTX5_C133	--	1.6	--	1.0	1.2	1.1	--	1.0	--	1.1
Q15118_C71	--	18.0	2.7	0.6	--	1.6	--	4.4	--	1.7
Q00765_C18	--	4.2	--	0.8	20.0	1.2	--	20.0	--	0.7
P22307_C71	--	8.3	--	2.0	3.7	4.9	--	1.1	--	8.3
O75521_C312	--	5.0	--	--	4.2	0.7	--	1.4	--	1.6
P49189_C288	20.0	20.0	--	--	1.8	--	12.0	0.9	--	1.0
Q5T440_C170	2.4	5.7	--	--	--	1.2	--	1.2	--	1.6
Q15084_C190	1.6	3.7	--	--	20.0	--	--	1.1	--	--
Q96C19_C172	--	2.4	--	0.9	0.9	0.7	--	1.0	--	--
P22061_C102	1.3	1.6	--	0.8	5.8	0.9	--	1.0	--	--
Q9NP73_C86	--	--	--	0.7	--	0.9	1.4	1.1	--	--
Q9BRF8_C54	1.9	3.8	--	1.0	1.2	1.4	--	0.9	--	--
Q6ICB0_C108	--	--	--	0.7	--	--	4.0	--	--	0.6
P29590_C389	--	7.9	--	0.5	--	1.3	--	1.2	--	20.0
P07858_C211	--	7.4	--	1.1	--	1.6	--	1.0	--	2.6
Q9NX18_C83	--	4.4	--	1.1	20.0	--	--	2.2	--	1.3
P46109_C249	4.0	20.0	--	--	20.0	--	1.8	1.3	--	0.9
P45984_C177	3.8	20.0	--	0.9	2.1	--	--	1.5	--	--
P19447_C342	2.7	20.0	--	0.7	6.7	1.1	--	2.5	--	2.0
P42166_C341	1.5	--	--	0.8	--	1.3	1.4	2.3	--	1.7
Q8N1F7_C522	3.7	--	--	--	20.0	--	2.2	3.2	20.0	--
Q86UY8_C276	--	5.8	--	1.4	20.0	1.5	--	2.8	--	1.8
Q8WWI1_C228	1.4	17.2	--	1.3	20.0	2.0	1.0	--	--	1.1
Q9NWA0_C139	--	2.9	--	--	20.0	1.1	--	--	--	1.5
P09110_C381	0.9	--	--	0.8	4.5	--	--	1.0	--	--
Q2NL82_C126	--	4.9	--	--	20.0	--	--	0.8	--	1.5
Q5JPI3_C308	4.0	--	--	1.0	--	1.1	1.7	3.2	--	0.9
P23919_C163	2.4	--	--	0.2	--	--	--	0.9	--	--
Q96EB1_C218	3.7	1.1	--	--	--	1.2	1.7	--	--	0.7
Q96FX7_C209	16.1	--	--	--	20.0	2.1	6.8	2.7	--	2.0
O14933_C98	2.8	20.0	3.2	--	--	--	--	2.5	--	0.7
Q29RF7_C242	--	--	--	0.9	12.9	--	--	1.8	--	0.9
Q96T76_C819	4.0	--	3.0	0.8	--	--	--	3.4	--	--
P23919_C117	1.4	0.4	--	--	0.2	0.6	--	1.2	--	0.9
Q15149_C4574	--	2.2	--	1.1	--	1.4	--	1.2	--	1.0

【０５９６】

【表１２－４】

Q96RP9_C153	2.8	14.8	--	--	20.0	--	0.8	1.2	--	1.4
P04818_C199	11.7	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--
P27708_C73	2.2	--	--	--	--	--	5.0	20.0	3.7	0.6
P55265_C1224	--	10.7	--	--	--	1.9	--	4.2	--	2.2
Q9Y3D2_C105	--	20.0	--	1.3	20.0	--	--	2.7	--	--
O00244_C12	1.6	2.1	--	0.7	--	1.5	--	0.7	--	0.7
Q8WV74_C207	20.0	--	20.0	--	--	13.1	--	20.0	--	--
Q9NRW3_C130	6.2	--	--	--	--	--	--	--	1.4	1.3
P24468_C326	--	20.0	--	0.9	--	--	--	4.9	--	1.1
P42166_C684	--	5.2	--	0.7	--	1.2	--	3.1	--	--
Q96EY5_C231	2.1	--	--	0.7	--	--	--	--	--	0.7
P14635_C238	2.1	6.7	--	0.7	--	1.3	1.5	2.6	--	--
Q8NDH3_C81	--	5.7	--	--	20.0	--	--	1.4	--	1.6
Q9P0J1_C149	--	18.0	--	1.4	18.5	--	--	1.3	--	--
Q96P48_C900	--	1.8	--	--	1.9	1.2	--	--	--	0.7
Q96HE7_C37	--	--	--	--	--	--	1.4	1.4	--	--
Q07065_C100	--	--	--	1.0	20.0	1.6	--	11.2	--	2.2
Q9BRJ7_C88	4.0	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--
O75439_C265	1.7	--	2.1	1.0	--	--	--	20.0	--	--
O43175_C369	2.0	--	2.4	--	--	--	2.0	--	20.0	1.0
Q9UNI6_C265	--	1.2	--	--	1.2	--	--	0.7	--	--
Q06203_C100	2.9	--	20.0	--	--	--	2.0	--	--	--
A0AVT1_C347	2.6	--	20.0	1.6	--	1.3	--	--	--	--
Q86X76_C203	20.0	--	--	0.8	3.9	--	--	0.7	--	0.8
Q6XZF7_C691	10.0	20.0	20.0	--	--	1.6	--	--	--	0.8
Q15398_C129	--	--	--	0.6	--	--	--	--	--	--
O75717_C773	--	2.2	--	1.2	--	1.1	--	1.7	--	--
Q01433_C107	1.4	--	--	0.6	--	--	--	--	--	--
Q8WVV9_C464	--	--	--	0.9	20.0	--	--	2.2	--	1.4
O14733_C131	--	1.8	--	--	1.7	--	1.6	--	20.0	0.7
Q14137_C404	2.1	20.0	--	--	--	1.1	--	--	--	1.1
Q96RU2_C171	--	--	--	2.2	20.0	--	--	1.3	--	--
Q9Y679_C391	--	--	--	3.0	--	--	--	--	--	1.5
P51610_C1872	1.0	1.5	--	0.5	--	1.0	--	1.1	--	--
P22307_C307	--	--	--	2.9	20.0	--	--	0.9	--	20.0
Q9BTE3_C325	5.4	--	--	--	--	--	--	5.7	--	--
Q9HA64_C24	1.6	--	--	--	--	--	--	1.7	--	0.6
Q5TFE4_C119	20.0	--	20.0	--	--	--	1.7	3.8	--	1.2
Q96N67_C2125	--	--	--	--	--	--	--	1.8	--	--
P52948_C1312	--	20.0	--	--	20.0	1.2	--	1.7	--	1.1
Q5UIP0_C2298	--	20.0	--	1.3	--	--	--	20.0	--	0.9
P51812_C436	1.8	--	--	0.5	1.4	1.0	--	0.6	--	--
Q92616_C1692	--	--	--	--	--	--	0.9	20.0	--	--
Q15345_C297	--	--	--	1.1	--	1.6	--	5.8	--	1.1
Q9NPH0_C267	2.6	13.4	--	--	--	--	--	1.2	--	--
P04183_C66	1.8	--	--	0.6	--	1.0	--	--	--	--
P42166_C629	--	2.5	--	0.6	--	1.0	--	20.0	--	1.6
Q15013_C124	--	--	--	1.0	--	--	--	1.4	--	--
Q9Y5Y2_C72	1.3	1.3	--	0.5	--	--	1.5	--	--	--
O15446_C86	--	4.7	--	--	3.3	1.3	--	1.0	--	1.7
Q13630_C116	1.6	20.0	--	--	--	--	1.2	--	--	0.8
Q8IYQ7_C324	--	5.3	--	--	--	1.3	--	1.6	--	2.0
P05091_C319	20.0	--	--	--	20.0	--	--	3.3	--	--
Q29RF7_C532	--	20.0	--	--	--	--	2.0	2.5	--	--
Q9Y570_C381	--	4.7	--	--	--	0.9	--	--	--	--

【０５９７】

【表１２－５】

Q14980_C961	--	--	--	--	20.0	2.2	--	--	--	3.7
P53384_C235	--	--	--	0.5	--	--	--	--	--	--
Q15003_C418	2.5	--	--	1.6	--	--	--	--	--	--
P53634_C258	--	5.5	--	--	13.4	1.6	--	1.9	--	2.8
Q8NFF5_C499	12.1	--	--	1.6	--	--	--	20.0	--	--
Q9ULA0_C144	1.3	5.2	--	--	--	--	--	--	--	--
P22307_C94	--	--	--	3.3	20.0	--	--	1.0	--	--
O15294_C620	--	--	12.0	--	--	--	--	1.0	--	--
Q9Y5S2_C1517	--	--	--	1.2	--	--	--	0.9	--	--
Q8TD19_C623	20.0	--	--	--	--	--	20.0	--	--	0.8
Q8N2W9_C326	2.6	4.5	--	--	--	--	20.0	--	--	1.0
Q13158_C98	--	--	--	--	--	1.6	--	--	--	--
Q9UKX7_C151	1.8	--	--	1.0	6.7	--	--	1.8	--	--
Q6PCB5_C280	2.5	--	--	--	20.0	--	0.8	20.0	--	--
P10398_C597	1.3	1.4	--	--	--	--	1.0	--	--	0.7
Q9UL40_C68	20.0	--	--	--	20.0	--	20.0	20.0	--	--
P46013_C903	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q16667_C39	4.5	2.3	--	--	--	--	1.2	--	--	0.8
O75150_C890	--	4.2	--	1.1	--	--	--	1.1	--	--
Q00610_C870	--	--	--	0.9	1.7	--	--	20.0	--	--
Q9Y5T5_C205	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--	0.9
O95881_C66	20.0	--	--	--	20.0	20.0	--	1.3	--	--
Q7Z5K2_C160	--	20.0	--	1.0	--	--	--	2.4	--	--
P42166_C518	1.3	4.2	--	0.8	--	--	--	--	--	1.4
Q9Y2S7_C143	--	13.9	--	--	--	--	--	1.3	--	--
E2QRD5_C183	--	--	--	0.9	--	--	--	--	--	0.8
O95833_C22	--	--	--	--	--	--	--	0.8	--	1.0
O94953_C694	4.2	--	3.9	--	--	--	1.5	--	--	--
O00541_C272	--	--	--	1.0	--	1.4	--	3.8	--	--
Q9NXJ5_C149	20.0	--	11.0	--	3.9	--	20.0	--	--	--
Q8N5L8_C131	--	--	--	--	--	1.2	--	1.3	--	0.8
Q8IZ73_C246	6.5	--	--	--	--	--	--	--	--	1.8
Q99798_C385	--	0.7	--	--	--	--	--	--	--	2.0
Q9GZR2_C382	1.0	--	--	--	20.0	--	0.9	1.2	--	--
Q13613_C117	4.3	--	--	--	--	--	--	1.0	1.7	0.9
Q9NUI1_C22	--	--	--	2.1	--	--	--	1.1	--	--
Q02556_C306	5.5	--	--	--	--	--	1.5	--	--	--
Q9UPT9_C171	4.4	--	9.3	0.8	--	--	3.2	--	--	--
Q8N999_C302	20.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8IU81_C363	--	5.9	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9C0I1_C152	--	--	--	--	20.0	--	6.5	--	--	0.7
Q9P2X3_C195	--	--	--	--	--	--	--	1.6	--	--
Q6QNY0_C168	4.6	--	--	--	--	--	1.2	--	--	--
Q15796_C81	5.6	--	--	--	--	--	--	--	--	1.3
Q9NZB2_C531	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--	1.6
Q9HB90_C377	20.0	--	--	--	--	--	--	1.1	--	--
Q9BR61_C267	--	--	--	--	--	1.1	--	--	6.9	--
P16455_C145	20.0	--	20.0	--	--	--	--	--	--	--
Q86UV5_C39	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.4
A2A288_C367	5.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8NEC7_C140	--	--	--	--	--	1.8	20.0	--	--	--
Q6PJG6_C673	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q13232_C158	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q86X76_C165	20.0	--	--	--	--	--	--	0.8	--	--
P42695_C541	--	20.0	6.5	--	--	--	--	--	--	2.3

【０５９８】

【表１２－６】

P41226_C599	20.0	8.0	--	--	--	--	--	--	--	1.0
Q99986_C50	--	--	0.7	--	--	--	--	1.6	--	--
Q8WUM4_C90	5.0	--	--	--	--	--	--	1.0	--	--
P29590_C213	4.5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9P0K7_C973	--	--	--	0.8	--	--	--	--	--	--
P53992_C78	--	--	--	--	--	0.7	--	--	--	--
Q13867_C73	--	4.2	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8ND24_C655	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96EK4_C48	2.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96IV0_C309	6.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C414	3.7	11.3	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UHQ1_C99	20.0	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--
O43396_C34	--	--	--	--	--	--	--	7.3	--	--
Q8IV53_C174	--	--	5.0	--	--	--	--	--	--	--
Q8N9T8_C673	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０５９９】

【表１３－１】
表2C

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
P04406_C152	0.5	0.8	1.2	0.8	1.0	1.1	0.9	0.6	20.0	1.0	0.9
P61978_C132	0.9	1.0	1.2	0.9	1.1	1.3	1.0	0.9	9.3	1.2	0.8
Q13526_C113	0.5	0.7	1.0	0.6	1.1	1.2	1.0	0.6	10.0	1.4	--
P24752_C119	1.6	1.0	1.2	0.6	0.7	2.3	1.2	1.9	12.4	0.7	0.8
P24752_C413	1.9	1.0	1.2	1.0	--	20.0	1.1	0.9	20.0	1.1	0.7
Q9NUY8_C283	0.6	0.7	1.3	0.6	--	1.6	1.0	0.7	2.7	2.1	0.9
P13667_C206	1.0	1.3	1.4	0.8	1.1	2.7	0.9	1.0	1.9	5.3	0.8
P12268_C140	0.5	0.6	1.6	0.6	1.0	1.4	1.2	0.7	1.9	1.0	1.1
Q15365_C194	0.5	--	1.0	0.7	1.6	2.2	2.5	0.3	1.5	0.6	1.2
Q9NVC6_C649	1.3	1.1	1.6	0.8	--	1.2	1.2	0.8	20.0	--	0.8
P42166_C561	0.8	1.1	0.9	1.3	2.5	2.9	20.0	0.7	20.0	1.3	1.1
Q9Y696_C35	1.0	2.7	1.0	0.6	--	8.9	1.0	0.6	1.4	2.6	0.9
P10599_C32	2.5	20.0	1.9	1.2	1.7	20.0	2.1	0.4	5.7	13.9	1.5
P31943_C267	1.1	--	1.4	0.7	0.9	1.3	1.2	1.0	3.6	1.3	0.8
Q86SX6_C67	1.5	--	1.2	--	0.7	1.0	1.0	1.0	9.1	1.0	0.8
P15121_C299	0.5	0.8	1.1	0.8	1.3	0.7	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9
P52597_C267	1.0	--	1.2	1.2	1.3	1.6	1.8	0.8	4.1	1.3	0.9
Q9ULV4_C420	0.8	0.7	--	0.8	1.1	1.6	1.4	0.8	3.2	1.1	1.0
P62888_C92	0.6	0.9	2.0	--	--	1.1	3.2	0.8	2.2	0.9	0.9
Q9NQR4_C153	1.3	--	--	0.6	1.4	1.0	1.1	0.7	2.0	0.6	0.8
P42765_C92	1.2	--	0.9	0.8	1.2	1.3	0.9	1.1	15.1	1.1	--
Q15084_C55	1.2	1.4	1.0	0.7	--	3.7	0.8	0.9	2.0	5.0	0.8
Q96HE7_C241	0.9	1.1	1.3	0.7	--	2.3	1.6	0.7	2.1	1.7	0.9
Q99439_C164	--	0.9	1.0	0.7	1.3	1.5	1.5	0.4	1.8	--	1.2
P25205_C119	1.0	--	1.3	0.5	--	1.2	0.9	0.9	6.2	2.6	1.0
Q9NS86_C187	0.4	--	1.7	0.5	--	1.5	2.0	0.6	3.1	2.0	1.2
Q15233_C145	1.2	1.1	--	0.7	0.8	1.3	0.9	1.1	3.7	1.6	0.8
Q9BRA2_C43	20.0	--	2.3	0.6	--	20.0	1.1	0.6	8.0	--	3.9
P35611_C68	0.9	1.7	--	--	--	1.6	1.4	0.9	20.0	1.0	0.8
O75521_C380	1.6	0.8	1.2	--	--	0.7	0.9	1.1	1.2	1.0	1.1
Q9BXW7_C392	1.3	1.0	1.5	--	--	1.1	0.8	1.0	4.9	1.1	0.8
P30101_C406	1.2	--	1.5	0.8	1.1	--	0.8	1.0	2.6	6.0	0.7
Q96AB3_C114	1.0	0.8	1.1	0.7	--	0.9	1.2	0.7	3.1	0.8	--
P13667_C555	1.2	--	1.5	0.8	1.1	--	0.8	1.0	2.6	6.0	0.7
Q09161_C44	0.8	--	1.1	0.6	--	1.1	1.2	0.8	2.5	1.2	1.0
P78417_C32	20.0	20.0	20.0	0.8	2.6	20.0	1.0	0.3	1.9	--	1.3
Q9ULW0_C536	1.1	1.0	1.8	--	--	2.2	1.2	1.2	20.0	1.4	--
Q9NRG0_C55	0.9	--	1.5	--	1.6	1.1	1.0	0.9	20.0	1.1	1.0
Q96T76_C848	0.5	0.8	1.0	20.0	--	--	--	0.7	20.0	--	1.4
Q8TAQ2_C145	2.1	0.9	2.7	0.8	1.1	1.3	1.3	1.2	2.9	1.2	0.8
Q9BVC5_C10	1.1	0.9	1.8	--	--	1.3	0.9	1.0	3.4	1.0	0.8
Q7Z2W4_C645	0.8	--	1.6	--	--	2.1	0.9	0.9	4.6	1.6	0.9
Q9BQ69_C186	2.4	--	1.5	0.5	--	0.9	3.6	1.2	3.3	1.2	0.8
Q16831_C162	0.5	0.7	--	--	--	1.3	1.4	0.8	1.3	1.1	1.1
P30101_C57	1.1	1.6	1.2	0.9	--	--	0.9	1.3	2.6	--	0.7
P12268_C331	0.7	0.8	1.3	1.0	1.1	1.5	1.3	0.8	4.1	--	--
O95571_C170	1.1	--	1.5	--	--	1.2	--	1.1	3.1	--	0.8

【０６００】

【表１３－２】

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
O00299_C24	0.7	--	1.1	0.6	--	8.4	1.0	0.6	--	--	0.9
O14879_C343	0.4	0.7	--	0.9	--	2.4	--	0.3	4.0	1.3	1.2
Q96CM8_C64	1.8	--	2.3	0.8	--	2.3	1.1	0.8	20.0	--	0.8
P51946_C244	1.1	--	1.1	--	--	0.9	1.0	1.2	2.4	0.7	1.0
P49588_C773	0.6	--	1.1	--	1.2	--	0.7	0.7	10.1	--	--
Q96RN5_C618	0.8	0.7	1.3	0.9	--	2.0	1.4	--	20.0	2.1	0.8
O15294_C758	1.0	1.0	--	--	--	1.2	--	0.9	2.9	1.1	1.0
P46734_C207	0.8	--	--	--	--	1.2	1.5	0.7	1.5	0.7	1.3
Q96S55_C272	0.9	0.5	--	--	--	1.2	1.3	0.8	2.5	0.9	0.9
O95229_C54	0.5	0.7	1.2	--	--	--	--	0.6	--	1.0	1.0
O60610_C1227	0.5	--	1.6	0.6	1.2	--	0.3	0.6	3.0	--	1.2
Q13428_C38	1.3	1.0	1.5	--	--	--	1.1	1.1	2.8	1.1	0.8
Q9Y277_C65	1.6	1.2	--	--	1.0	--	20.0	1.4	--	--	0.9
P57764_C268	0.6	--	1.1	--	3.1	--	1.8	0.6	20.0	1.8	0.8
Q9Y3A3_C134	--	--	1.2	1.0	1.8	1.2	1.0	0.9	2.3	--	0.9
Q02252_C317	2.0	1.1	1.2	--	--	2.3	2.4	0.8	2.6	--	--
Q9NYL9_C132	0.6	0.7	0.9	0.7	0.7	--	2.6	0.3	0.9	0.8	--
P83731_C6	0.4	--	1.6	--	--	1.6	2.1	0.3	1.2	--	--
O95336_C32	0.5	--	3.0	--	1.7	2.3	2.8	0.6	--	--	0.9
Q13155_C291	0.7	0.9	--	0.8	--	--	1.7	0.7	7.3	1.1	1.1
Q13418_C346	0.6	--	--	0.6	--	1.4	1.0	0.6	--	0.8	--
A6NDU8_C179	0.7	0.8	1.0	--	--	7.4	1.4	0.6	20.0	--	1.2
Q9UKF6_C498	1.5	--	2.3	--	--	1.6	--	1.0	20.0	--	1.0
Q96F86_C413	0.7	--	1.9	--	1.3	3.0	--	--	20.0	20.0	1.2
P42224_C492	--	0.8	3.8	0.8	1.9	1.3	--	0.6	20.0	2.4	1.2
P11216_C326	0.7	--	--	0.5	--	1.6	1.2	0.7	5.3	0.8	--
P21980_C277	0.6	0.4	--	--	--	--	1.4	0.6	1.1	1.0	--
Q9HAV7_C124	0.6	--	1.0	--	--	--	1.0	0.6	2.1	--	0.7
P24752_C126	--	1.2	1.2	0.7	--	20.0	--	0.8	--	--	0.8
Q9NQ88_C161	0.6	--	1.3	1.0	2.6	--	--	--	20.0	--	1.4
Q13155_C23	0.7	--	1.6	--	--	1.4	1.4	--	4.4	1.2	0.9
Q9NQW6_C712	1.0	0.9	--	0.7	--	1.5	1.5	0.7	5.9	--	1.0
P51649_C340	0.9	--	1.0	--	1.0	0.9	--	--	2.4	--	--
Q15021_C439	0.6	0.9	1.4	20.0	--	--	1.1	0.8	--	1.1	1.2
Q5T0N5_C69	0.6	--	--	--	--	2.6	1.5	0.6	5.4	1.7	1.0
P38606_C138	4.6	--	--	--	1.7	20.0	2.1	0.8	--	10.6	1.1
Q9HCC0_C216	1.0	--	--	--	--	1.0	--	1.0	7.0	0.9	0.7
Q9NQC3_C1101	1.4	--	--	12.8	--	2.1	20.0	1.0	--	1.2	0.8
P35754_C23	0.7	1.4	--	0.6	1.1	20.0	0.9	0.5	16.3	--	0.9
Q99757_C90	6.3	--	1.6	1.4	--	--	3.6	0.5	6.7	5.0	--
Q9Y3D0_C93	0.7	0.8	1.0	--	--	--	2.4	0.6	20.0	20.0	--
Q9UMS0_C213	1.3	--	2.0	1.5	--	1.9	3.5	0.9	7.1	1.8	0.7
Q9NXV6_C516	1.4	--	1.1	--	--	1.4	1.8	0.9	--	--	--
Q96RS6_C376	--	--	1.3	0.8	--	--	1.3	0.7	--	--	--
Q14997_C1840	20.0	0.9	--	--	1.2	--	20.0	0.9	--	20.0	--
P50570_C27	0.5	--	1.0	--	--	--	0.9	0.5	15.4	1.1	--
Q86YH6_C71	1.3	--	1.1	--	--	--	--	0.9	20.0	--	1.0
Q99497_C106	0.9	1.0	--	0.8	1.0	--	1.1	0.6	20.0	1.4	--
Q9UJW0_C258	0.8	--	20.0	--	--	--	--	0.7	2.7	1.1	1.3

【０６０１】

【表１３－３】

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
Q9BUH6_C180	--	1.1	1.5	0.8	--	1.4	1.4	0.6	5.5	--	1.3
P24752_C196	--	--	1.1	--	--	3.4	1.0	0.9	--	--	0.8
Q13162_C51	0.9	--	--	--	1.3	1.7	2.4	--	2.3	--	1.0
Q9BTA9_C553	--	--	1.1	--	--	--	1.1	1.0	19.1	1.2	0.9
P48643_C253	--	0.8	--	0.5	1.0	--	1.1	0.8	1.2	0.8	0.9
O75362_C286	1.0	0.9	1.0	--	--	--	--	1.0	20.0	--	0.9
O60825_C158	--	--	0.9	--	1.3	--	--	0.7	1.3	0.9	1.2
Q8NBS9_C350	1.1	1.1	--	0.8	--	2.6	--	0.9	2.1	--	0.8
Q9NYL2_C22	0.7	--	1.2	--	--	1.5	--	0.6	2.3	--	1.0
P27707_C9	--	--	1.2	--	1.2	1.9	1.8	0.4	--	--	--
Q93009_C223	1.1	1.0	1.0	--	--	--	0.8	--	20.0	1.0	--
O14929_C101	--	--	1.0	--	--	1.3	1.1	0.6	20.0	--	--
Q9UPQ0_C140	0.7	--	--	--	--	2.5	2.5	0.5	20.0	--	1.1
Q96NY7_C487	--	--	--	0.5	--	14.9	--	0.4	1.8	--	1.3
Q9NQ88_C114	0.4	--	0.9	--	--	--	--	0.6	4.6	--	--
Q14790_C360	0.4	--	1.6	0.5	--	3.2	1.0	0.5	20.0	--	1.2
P04183_C230	--	--	1.2	--	2.1	1.6	2.8	0.6	2.0	0.7	--
P68366_C54	0.3	--	1.0	--	1.1	--	2.0	--	--	--	--
Q13428_C1298	1.0	0.9	--	--	2.2	--	2.0	1.0	4.7	--	--
Q5MNZ6_C63	--	1.7	--	--	--	1.6	--	0.8	2.6	--	0.7
O14980_C528	--	--	1.1	--	--	--	2.1	0.9	--	1.1	--
Q86W42_C35	1.3	1.3	--	0.5	--	1.6	0.8	1.1	20.0	1.4	0.7
Q9Y6G9_C51	0.6	0.7	--	--	1.6	1.8	--	0.7	--	--	--
Q9NY27_C22	--	--	1.7	--	--	--	1.0	0.8	20.0	2.2	--
Q8NFH5_C255	--	--	1.6	--	--	--	1.1	0.8	5.5	--	--
Q9Y676_C128	1.0	--	--	--	--	--	1.0	--	2.0	1.0	--
P35658_C728	--	--	1.7	0.7	--	6.4	--	1.1	3.1	--	--
Q9NTX5_C133	1.5	--	--	--	--	1.0	--	--	4.2	--	0.9
Q15118_C71	1.5	--	1.8	--	--	--	1.3	--	20.0	--	--
Q00765_C18	1.1	--	1.4	--	--	1.1	--	--	20.0	--	0.9
P22307_C71	20.0	--	--	--	--	--	--	1.2	16.8	5.6	--
O75521_C312	1.1	--	--	--	--	--	1.1	--	0.7	--	0.9
P49189_C288	--	--	--	--	--	20.0	0.7	0.8	20.0	--	0.9
Q5T440_C170	--	--	1.3	--	--	2.5	--	0.7	3.5	--	1.0
Q15084_C190	1.0	--	1.0	1.0	--	--	1.0	0.9	2.8	--	--
Q96C19_C172	--	--	1.2	1.6	--	--	0.7	0.5	--	1.2	--
P22061_C102	2.2	--	1.2	--	--	--	--	0.7	--	--	--
Q9NP73_C86	0.4	--	2.0	--	--	--	1.3	0.5	20.0	1.3	--
Q9BRF8_C54	--	--	1.5	--	--	1.8	--	0.7	20.0	--	--
Q6ICB0_C108	1.9	--	1.0	1.2	1.3	--	1.1	--	3.1	1.1	--
P29590_C389	0.5	--	--	1.1	--	--	2.2	0.4	3.4	0.9	--
P07858_C211	0.8	--	--	--	--	2.2	1.8	0.4	2.4	--	--
Q9NX18_C83	1.5	--	1.9	--	--	--	--	--	3.7	1.0	0.7
P46109_C249	--	--	4.2	--	--	--	1.6	--	20.0	--	0.8
P45984_C177	0.5	--	1.7	--	--	2.0	--	0.5	--	--	1.1
P19447_C342	--	--	--	--	--	--	1.0	0.7	5.9	--	0.7
P42166_C341	0.6	--	--	--	2.0	--	--	0.5	--	1.2	--
Q8N1F7_C522	--	--	1.7	--	3.6	1.7	1.7	0.8	20.0	--	--
Q86UY8_C276	1.7	--	--	--	--	0.8	--	1.7	2.1	1.2	--

【０６０２】

【表１３－４】

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
Q8WWI1_C228	0.8	--	1.0	--	--	--	--	0.8	20.0	--	--
Q9NWA0_C139	1.3	--	0.7	--	--	1.6	--	0.8	--	--	1.1
P09110_C381	--	0.8	--	0.7	--	--	0.8	0.9	1.2	--	0.8
Q2NL82_C126	0.4	--	--	--	--	--	0.9	0.8	20.0	1.9	--
Q5JPI3_C308	0.7	--	1.3	--	--	--	--	0.7	--	--	0.7
P23919_C163	0.2	0.4	--	--	1.0	--	5.7	0.2	--	--	0.9
Q96EB1_C218	0.6	--	1.1	--	--	--	1.3	--	20.0	--	--
Q96FX7_C209	--	--	--	--	--	--	1.0	--	20.0	--	0.9
O14933_C98	--	--	2.4	--	1.9	--	1.6	0.5	20.0	--	--
Q29RF7_C242	0.9	1.0	--	--	--	--	1.0	--	--	1.8	1.0
Q96T76_C819	0.5	--	--	20.0	20.0	--	4.6	0.6	20.0	--	0.9
P23919_C117	--	--	1.6	--	--	2.5	4.4	--	--	--	--
Q15149_C4574	1.3	--	--	--	--	1.4	--	0.9	--	--	1.0
Q96RP9_C153	1.6	--	1.2	--	--	--	--	1.1	--	--	--
P04818_C199	0.5	--	2.5	--	--	--	20.0	0.7	20.0	20.0	--
P27708_C73	0.5	--	1.8	--	--	--	--	0.7	--	--	--
P55265_C1224	1.4	--	1.8	--	--	1.6	--	--	20.0	1.3	--
Q9Y3D2_C105	1.5	--	--	--	--	--	1.6	1.2	20.0	--	--
O00244_C12	0.4	--	1.4	--	--	1.8	--	--	--	--	--
Q8WV74_C207	2.2	--	--	--	--	--	--	0.9	20.0	--	--
Q9NRW3_C130	1.3	--	13.3	--	--	--	--	0.9	20.0	--	0.9
P24468_C326	1.2	--	--	--	--	--	--	0.8	20.0	--	--
P42166_C684	--	--	--	--	3.3	--	3.0	--	6.8	1.2	1.1
Q96EY5_C231	0.6	--	1.1	--	--	1.2	1.8	--	--	--	--
P14635_C238	--	--	--	--	--	1.2	1.8	0.5	--	--	--
Q8NDH3_C81	--	--	--	1.0	--	--	2.0	--	--	--	1.0
Q9P0J1_C149	--	--	--	1.0	--	--	--	0.9	20.0	--	0.8
Q96P48_C900	--	--	1.1	1.1	--	1.7	--	0.5	--	--	--
Q96HE7_C37	--	--	2.1	0.6	--	--	3.4	0.4	20.0	--	--
Q07065_C100	--	--	--	--	--	1.7	--	1.0	20.0	--	--
Q9BRJ7_C88	--	--	1.7	--	2.9	--	--	0.4	--	1.6	1.0
O75439_C265	1.6	0.6	--	1.0	1.4	--	--	1.3	--	--	--
O43175_C369	--	--	1.1	20.0	20.0	--	--	--	--	--	--
Q9UNI6_C265	0.6	0.8	--	--	--	--	1.0	1.0	7.5	--	--
Q06203_C100	0.8	--	1.6	0.6	1.2	--	1.2	--	--	--	--
A0AVT1_C347	0.8	--	--	--	1.9	--	--	0.6	--	--	--
Q86X76_C203	--	--	--	--	--	--	--	1.3	20.0	--	0.8
Q6XZF7_C691	--	--	--	2.3	--	2.5	--	--	--	--	--
Q15398_C129	0.5	--	1.2	--	2.4	1.3	1.4	--	--	7.4	1.3
O75717_C773	--	--	--	--	--	--	2.3	1.0	3.6	--	0.9
Q01433_C107	0.4	--	--	0.7	--	--	--	0.5	--	--	--
Q8WVV9_C464	--	--	--	--	--	2.2	1.5	--	20.0	3.2	--
O14733_C131	--	--	1.0	--	--	--	20.0	0.8	--	--	--
Q14137_C404	0.6	--	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96RU2_C171	1.1	1.1	--	--	--	--	0.8	--	--	--	--
Q9Y679_C391	1.2	--	--	--	--	--	--	--	20.0	20.0	0.7
P51610_C1872	--	--	--	--	--	--	1.3	0.5	--	--	--
P22307_C307	--	--	--	--	--	--	--	1.1	--	--	--
Q9BTE3_C325	--	1.0	--	1.9	3.5	--	2.2	0.6	20.0	--	--

【０６０３】

【表１３－５】

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
Q9HA64_C24	--	--	--	--	--	--	1.7	--	--	--	1.0
Q5TFE4_C119	--	--	--	3.1	--	--	--	0.5	--	--	--
Q96N67_C2125	0.9	--	--	0.8	--	--	1.5	0.7	--	--	0.9
P52948_C1312	1.3	--	--	--	--	1.8	1.3	--	--	--	--
Q5UIP0_C2298	--	--	--	--	--	3.4	--	1.2	20.0	--	--
P51812_C436	--	--	1.3	--	--	--	--	4.5	--	--	--
Q92616_C1692	0.5	--	--	0.6	2.0	1.2	--	0.7	--	--	--
Q15345_C297	--	--	--	0.9	--	1.9	1.4	0.8	--	--	--
Q9NPH0_C267	1.3	--	2.1	--	--	--	--	--	20.0	--	--
P04183_C66	--	--	1.6	0.7	--	--	--	0.4	--	--	--
P42166_C629	--	--	1.6	--	--	--	--	--	--	--	--
Q15013_C124	1.0	1.0	--	--	--	--	--	--	20.0	1.2	--
Q9Y5Y2_C72	--	--	1.1	--	--	--	1.7	--	--	--	--
O15446_C86	--	--	--	--	--	1.6	--	--	4.6	--	--
Q13630_C116	--	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--
Q8IYQ7_C324	--	--	--	--	--	1.4	--	--	--	--	--
P05091_C319	--	--	10.5	--	--	--	--	0.9	20.0	--	--
Q29RF7_C532	--	--	--	5.1	8.1	--	--	0.8	--	--	--
Q9Y570_C381	--	--	1.2	--	--	--	--	0.2	--	--	--
Q14980_C961	2.4	--	--	1.1	--	4.8	2.6	--	--	--	--
P53384_C235	--	--	--	0.7	--	--	2.0	0.2	--	--	--
Q15003_C418	--	--	1.4	--	--	--	--	--	20.0	--	1.3
P53634_C258	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8NFF5_C499	--	--	3.4	--	--	--	--	--	--	--	1.3
Q9ULA0_C144	--	--	1.3	--	--	--	--	0.8	--	--	0.9
P22307_C94	--	20.0	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--
O15294_C620	--	--	2.6	1.1	--	--	--	1.0	--	--	--
Q9Y5S2_C1517	--	--	--	--	--	--	--	0.4	20.0	--	--
Q8TD19_C623	--	--	--	0.7	1.4	--	--	0.6	--	--	--
Q8N2W9_C326	--	--	--	--	--	--	0.9	0.8	--	--	--
Q13158_C98	0.6	--	1.3	0.9	--	--	1.5	--	--	--	--
Q9UKX7_C151	--	--	--	--	--	--	--	0.8	--	--	--
Q6PCB5_C280	1.0	--	1.4	--	--	--	--	--	--	--	--
P10398_C597	--	--	1.2	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UL40_C68	1.9	--	2.4	--	--	--	--	--	--	--	--
P46013_C903	--	--	1.6	--	--	--	1.1	1.0	20.0	1.1	--
Q16667_C39	--	--	1.7	--	--	--	--	--	--	--	--
O75150_C890	1.2	--	--	0.7	--	--	--	1.3	--	--	--
Q00610_C870	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--
Q9Y5T5_C205	1.2	--	--	--	--	--	1.5	--	--	--	--
O95881_C66	--	--	--	--	--	--	1.0	1.0	--	--	--
Q7Z5K2_C160	--	--	0.7	--	--	--	--	1.0	--	--	--
P42166_C518	--	--	--	--	--	--	2.2	--	--	--	--
Q9Y2S7_C143	--	--	--	--	--	--	--	1.2	--	--	0.8
E2QRD5_C183	--	--	--	0.8	--	--	--	0.5	--	--	--
O95833_C22	--	--	--	0.5	--	--	--	--	13.8	--	--
O94953_C694	--	--	1.1	--	--	--	--	--	--	--	--
O00541_C272	--	--	--	--	--	--	--	0.9	--	--	--
Q9NXJ5_C149	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０６０４】

【表１３－６】

識別子	27_200uM_インサイツ_231	28_200uM_インサイツ_231	29_200uM_インサイツ_ramos	31_200uM_インサイツ_231	31_200uM_インサイツ_ramos	33_200uM_インサイツ_231	38_200uM_インサイツ_231	41_200uM_インサイツ_231	45_200uM_インサイツ_231	51_200uM_インサイツ_231	56_200uM_インサイツ_231
Q8N5L8_C131	--	--	--	--	--	1.7	--	--	7.3	--	--
Q8IZ73_C246	--	--	--	0.4	1.0	--	1.7	--	--	--	--
Q99798_C385	--	--	--	--	--	--	--	0.1	--	--	--
Q9GZR2_C382	--	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--
Q13613_C117	--	--	1.5	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9NUI1_C22	--	--	--	0.7	--	--	--	--	17.0	--	--
Q02556_C306	--	--	1.4	--	2.0	--	--	--	--	--	--
Q9UPT9_C171	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8N999_C302	--	0.6	--	--	--	--	--	0.3	20.0	--	--
Q8IU81_C363	--	--	--	0.7	--	--	1.3	--	1.7	--	--
Q9C0I1_C152	--	--	4.6	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9P2X3_C195	--	--	--	0.5	--	--	--	--	20.0	--	--
Q6QNY0_C168	--	--	1.6	--	--	--	1.0	--	--	--	--
Q15796_C81	--	--	1.3	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9NZB2_C531	--	--	--	--	--	2.4	--	--	--	--	0.6
Q9HB90_C377	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9BR61_C267	--	--	2.5	--	--	--	--	0.5	--	--	--
P16455_C145	--	--	--	--	1.2	--	--	--	--	--	--
Q86UV5_C39	--	--	--	--	1.3	--	--	--	--	--	--
A2A288_C367	--	--	1.3	--	1.9	--	--	--	--	--	--
Q8NEC7_C140	--	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--
Q6PJG6_C673	--	--	4.6	--	20.0	--	--	--	--	--	0.9
Q13232_C158	--	--	1.5	--	--	--	--	--	8.8	--	--
Q86X76_C165	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P42695_C541	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P41226_C599	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q99986_C50	--	--	--	--	--	--	--	--	4.1	--	--
Q8WUM4_C90	0.6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P29590_C213	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9P0K7_C973	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
P53992_C78	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q13867_C73	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8ND24_C655	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96EK4_C48	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q96IV0_C309	--	--	3.0	--	--	--	--	--	--	--	--
Q5T1V6_C414	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q9UHQ1_C99	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O43396_C34	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8IV53_C174	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Q8N9T8_C673	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【０６０５】

表３はシステイン含有タンパク質および潜在的な結合のシステイン部位のリストを示す。

【０６０６】

【表１４－１】
表３

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
O00170	AIP AH 受容体共役タンパク質	C122	未分類
O00541	PES1 Pescadillo 相同体	C272; C361	未分類
O00622	CYR61 タンパク質 CYR61	C39; C70; C134	未分類
O14920	核因子カッパ-B キナーゼ サブユニットの IKBKB 阻害剤	C464	酵素
O14933	UBE2L6 ユビキチン/ISG15 結合酵素 E2 L6 PCTK	C98	酵素
O14980	XPO1 エキスポーチン-1	C34; C528; C1070	未分類
O75362	ZNF217 ジンクフィンガータンパク質 217	C286	転写因子および制御因子
O94953	KDM4B リジン特異的デメチラーゼ 4B	C694	酵素
P00813	ADA アデノシンデアミナーゼ	C75	酵素
P04150	NR3C1 グルココルチコイド受容体	C302; C622	転写因子および制御因子
P09086	POU2F2 POU ドメイン, クラス 2, 転写因子 2	C346	転写因子および制御因子
P09211	GSTP1 グルタチオン S-トランスフェラーゼ P	C48	酵素
P14598	NCF1 好中球細胞質因子 1	C378	アダプター, 足場, モジュレータータンパク質
P15374	UCHL3 ユビキチンカルボキシル-末端ヒドロラーゼアイソザイム L3	C95	酵素
P16455	MGMT メチル化-DNA--タンパク質-システイン メチルトランスフェラーゼ	C145; C150	酵素
P17812	CTP シンターゼ 1	C491	酵素
P19447	ERCC3 TFIIH 基本転写因子複合体ヘリカーゼ	C342	酵素
P21580	TNFAIP3 腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質 3	C54	酵素
P24752	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	C119; C126; C196; C413	酵素
P40261	ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ	C165	酵素
P40763	STAT3 シグナル伝達性転写因子 3	C259	転写因子および制御因子
P41226	UBA7 ユビキチン様修飾酵素活性化酵素 7	C599	酵素
P42575	CASP2 カスパーゼ-2	C370	酵素
P43403	ZAP70 チロシン-タンパク質キナーゼ ZAP-70	C117	酵素
P48200	IREB2 鉄応答要素結合タンパク質 2	C137	転写因子および制御因子
P48735	IDH2 イソクエン酸デヒドロゲナーゼ	C308	酵素
P50851	LRBA リポ多糖類反応性およびベージュ様アンカータンパク質	C1704; C2675	未分類
P51617	IRAK1 インターロイキン-1 受容体関連の キナーゼ 1	C608	酵素
P61081	NEDD8 結合酵素 Ubc12	C47	酵素
P61088	ユビキチン結合酵素 E2 N	C87	酵素

【０６０７】

【表１４－２】

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
P63244	GNB2L1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質サブユニットベータ-２様 1	C182	チャネル、輸送体、受容体
P68036	UBE2L3 ユビキチン結合酵素 E2 L3	C86	酵素
Q00535	CDK5 サイクリン依存性キナーゼ 5	C157	酵素
Q01201	RELB 転写因子 RelB	C109	転写因子および制御因子
Q02556	IRF8 インターフェロン調節因子 8	C306	転写因子および制御因子
Q04759	PRKCQ タンパク質キナーゼ Cシータ型	C14; C17	酵素
Q06124	チロシン-プロテインフォスファターゼ非受容体 11型	C573	酵素
Q09472	EP300 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300	C1738	酵素
Q14790	CASP8 カスパーゼ-8	C360	酵素
Q15084	PDIA6 タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A6	C55; C58; C190; C193	酵素
Q15306	IRF4 インターフェロン調節因子 4	C194	転写因子および制御因子
Q15910	EZH2 ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ EZH2	C503	酵素
Q16186	プロテアソームユビキチン受容体 ADRM1	C88	チャネル、輸送体、受容体
Q16763	UBE2S ユビキチン結合酵素 E2 S	C118	酵素
Q16822	PCK2 ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	C306	酵素
Q16875	6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ 3	C155	酵素
Q16877	PFKFB4 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ	C159	酵素
Q6L8Q7	PDE12 2,5-ホスホジエステラーゼ 12	C108	酵素
Q70CQ2	USP34 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 34	C741; C1090	酵素
Q7Z2W4	ZC3HAV1 ジンクフィンガー CCCH 型抗ウイルスタンパク質 1	C645	転写因子および制御因子
Q86UV5	USP48 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 48	C39	酵素
Q8TAQ2	SMARCC2 SWI/SNF 複合体サブユニット SMARCC2	C145	転写因子および制御因子
Q92851	カスパーゼ-10	C401	酵素
Q93009	USP7 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7	C223; C315	酵素
Q96FA3	PELI1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼペリノ 相同体 1	C282	酵素
Q96GG9	DCUN1D1 DCN1 様タンパク質 1	C115	未分類
Q96JH7	VCPIP1 脱ユビキチン化タンパク質 VCIP135	C219	酵素
Q96RU2	USP28 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 28	C171; C733	酵素

【０６０８】

【表１４－３】

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
Q99873	PRMT1 タンパク質アルギニン N-メチルトランスフェラーゼ	C109	酵素
Q9C0C9	UBE2O ユビキチン結合酵素 E2 O	C375	酵素
Q9HB90	RRAGC Ras 関連の GTP 結合タンパク質 C	C358; C377	チャネル、輸送体、および受容体
Q9NRW4	二重特異性プロテインフォスファターゼ 22	C124	酵素
Q9NWZ3	IRAK4 インターロイキン-1 受容体関連の キナーゼ 4	C13	酵素
Q9NYL2	MLTK マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ・キナーゼ・キナーゼ MLT	C22	酵素
Q9UPT9	USP22 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 22	C44; C171	酵素
Q9Y3Z3	SAMHD1 SAM ドメインおよび HD ドメイン含有タンパク質 1	C522	酵素
Q9Y4C1	KDM3A リジン特異的デメチラーゼ 3A	C251	酵素
Q9Y5T5	USP16 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 16	C205	酵素

【０６０９】

表４は、ｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において断片求電子によって標的化された既知の共有結合性リガンドを有する代表的なシステインを示す。

【０６１０】

【表１５】

表４

タンパク質	リガンド結合されたシステイン	フラグメント	isoTOP-ABPPによって定量化された他のシステイン	前の共有結合阻害剤	システイン位置
BTK	C481	2, 3, 14, 31	C145, C337	イブルチニブ	活性部位
TGM2	C277	12, 14, 32	C10, C27, C230, C269, C290, C336, C370, C524, C545, C620	18d	活性部位
Map2k7	C131	2, 3, 11, 14, 20, 21, 38	C260, C280	イブルチニブ	活性部位
XPO1	C528	2, 3, 5, 14, 24, 31, 43, 56	C34, C119, C164, C199, C327, C498, C723, C1070	KPT-330	非活性部位
Casp5	C315	3, 50	—	Z-WEHD-CHO/FMK (SEQ ID NO: 863として開示された "WEHD")	活性部位
Casp8	C360	2, 4, 11	C236, C409	Z-VAD-FMK, CV8/9-AOMK	活性部位
ERCC3	C342	2, 3, 5, 8, 14, 21	—	トリプトライド	活性部位
Park 7 (トキソプラズマ DJ-1)	C106	2, 9, 8, 11, 13, 43, 45, 50, 52	, C46, C53	WRR-086	活性部位
GSTO1	C32	2-13, 16, 18-22, 33, 27-30, 32-34, 36, 39, 43, 49, 50, 52, 54, 55	C90, C192, C237	KT53	活性部位
ALDH2	C319	3, 8-10,12, 27, 28, 32, 39, 40, 43, 49, 50	C66, C179, C386, C472	ジスルフィラム	活性部位
CTSZ	C92	4, 11, 20, 28, 32	C89, C126, C132, C154, C170, C173, C179, C214	Cy5DCG04	活性部位

【０６１１】

表５はリガンド結合されたシステインの反応性ドッキングの結果を示す。

【０６１２】

【表１６】
表５

タンパク質	PDB ID:	ドッキングによって最もリガンド結合可能なシステイン	システイン位置	isoTOP-ABPPによって最もリガンド結合可能なシステイン	一致
Aldh2	1O05	C319	活性部位	C319	はい
BTK	1K2P	C481	活性部位	C481	はい
CASP8	1QTN	C360	活性部位	C360	はい
CCNB1	2JGZ	C238	非活性部位	C238	はい
CDKN3	1FQ1	C39	非活性部位	C39	はい
CLIC4	2AEH	C35	非活性部位	C35	はい
DTYMK	1E2G	C163	非活性部位	C163	はい
IDH1	3MAP	C269	非活性部位	C269	はい
IMPDH2	1NF7	C331	活性部位	C331, C140	はい
GLRX5	2WUL	C67	活性部位	C67	はい
GSTO1	1EEM	C32	活性部位	C32	はい
NME3	1ZS6	C158	非活性部位	C158	はい
PKM	4JPG	C423	非活性部位	C423	はい
SRC	2SRC	C277	活性部位	C277	はい
TIGAR	3DCY	C114	非活性部位	C114,C161	はい
TXNDC	1WOU	C43	活性部位	C43	はい
UGDH	3ITK	C276	活性部位	C276	はい
UPP1	3EUF	C162	非活性部位	C162	はい
XPO1	3GB8	C528	非活性部位	C528	はい
CDK5	1UNG	C157	非活性部位	C269	２番目
EDC3	3D3K	C311	非活性部位	C137, C413, C499	２番目
NR2F2	3CJW	C213	非活性部位	C326, C213 (インサイツ)	２番目
PDCD6IP	2R02	C231	非活性部位	C90	２番目
PRMT1	1ORI	C285	活性部位	C109	２番目
UBE2S	1ZDN	C118	非活性部位	C95	２番目
FNBP1	2EFL	C145	非活性部位	C70	いいえ
HAT1	2P0W	C120	非活性部位	C101	いいえ
MAPK9	3NPC	C163	活性部位	C177	いいえ
STAT1	1YVL	C543	非活性部位	C492, C255	いいえ

【０６１３】
表６は 組換え型タンパク質の断片標識化の部位を示す。下線部分は、断片が修飾されたシステインを示す。
【０６１４】
【表１７】
表６

タンパク質	システイン	断片 #	ペプチド	SEQ ID NO:	M+H 計算した (m/z)	M+H 観察した (m/z)	電荷
IMPDH2	C140	**14**	R.HGFCGIPITDTGR.M	45	715.86	715.86	2
TIGAR	C114	**5**	R.EECPVFTPPGGETLDQVK.M	143	1123.97	1123.97	2
CASP8	C360	**7**	K.VFFIQACQGDNYQK.G	335	660.98	660.98	3
IDH1	C269	**20**	K.SEGGFIWACK.N	260	702.84	702.84	2

【０６１５】

表７は、ＤＭＳＯ処理細胞対ＤＭＦ処理細胞を比較するｉｓｏＴＯＰ－ＡＢＰＰ実験において、Ｒ値（ＤＭＳＯ／ＤＭＦ）＞４を示したＣｙｓ残基として定義される、ヒトT細胞におけるＤＭＦ感受性Ｃｙｓ残基のリストを示す。

【０６１６】

【表１８－１】

表７

名称	フルネーム	タンパク質機能		残基	マウスで保存された	免疫学的役割
ADA	アデノシンデアミナーゼ	アデノシンデアミナーゼ		C75	はい	Ｔ細胞同時活性化の正の調節因子
AGFG2	Arf-GAP ドメインおよび FG リピート含有タンパク質 2	ＧＴＰアーゼ活性化因子		C39	はい	未知
AIP	AH 受容体共役タンパク質	転写因子結合		C122	はい	未知
CRKL	Crk 様 タンパク質	ポリ(A) RNA 結合		C249	はい	未知
FLII	タンパク質 flightless-1 相同体	アクチン結合		C46	はい	未知
GAK	サイクリン-G 関連のキナーゼ	セリン/トレオニン タンパク質 キナーゼ		C87	はい	未知
HUWE1	E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ HUWE1	E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ		C3372	はい	未知
IKBKB	核因子カッパ-B キナーゼ サブユニットの阻害剤	セリン キナーゼ		C464	はい	NF-κB 経路で IkB-α をリン酸化する
IL16	プロインターロイキン-16	サイトカイン		C1004	はい	CD4+リンパ球の遊走に影響を与える
IRF4	インターフェロン 調節因子 4	DNA 結合		C194	はい	樹状細胞及び B 細胞の発達に加えて、T/B の分化を調節する
IRF8	インターフェロン 調節因子 8	DNA 結合		C306	はい	免疫細胞において負の調節的役割を果たす。MHC クラス I 遺伝子の上流の調節領域に結合する。骨髄系細胞の発達及び分化を調節する。
KIAA0528	特徴づけられていないタンパク質	カルシウム依存性のリン脂質結合		C993	はい	未知
LAS1L	リボソーム生成タンパク質	ポリ(A) RNA 結合		C456	はい	未知

【０６１７】

【表１８－２】

MARS2	メチオニン--tRNA リガーゼ, ミトコンドリア	メチオニン-tRNA リガーゼ		C425	はい	未知
MAT2A	S-アデノシルメチオニンシンターゼ アイソフォーム型-2	メチオニン アデノシルトランスフェラーゼ		C56	はい	未知
MAT2A	S-アデノシルメチオニンシンターゼ アイソフォーム型-2	メチオニン アデノシルトランスフェラーゼ		C104	はい	未知
MTCH2	ミトコンドリア担体相同体 2	ミトコンドリア脱分極を誘発する		C296	はい	未知
PGP	ホスホグリコール酸ホスファターゼ	ホスファターゼ		C297	はい	未知
PML	タンパク質前骨髄球性白血病	RNA/DNA 結合		C479	はい	抗ウイルス反応を促進するためにインターフェロンによって誘発された TGF-ベータシグナル伝達を調節する
PRKCQ	タンパク質キナーゼ C シータ型	セリン/トレオニン タンパク質 キナーゼ		C14	はい	NF-κB 及び転写因子の活性化によって TCR シグナル伝達を促進する
PYGB	グリコーゲンホスホリラーゼ, 脳型	ホスホリラーゼ		C326	はい	未知
RARS	アルギニン--tRNA リガーゼ, 細胞質	tRNA 結合		C32	はい	未知
SON	タンパク質 SON	RNA/DNA 結合		C92	はい	未知
SYNE2	Nesprin-2	アクチン 結合		C553	はい	未知
TDRKH	Tudor および KH ドメイン含有タンパク質	RNA 結合		C109	はい	未知
THNSL1	トレオニンシンターゼ様 1	トレオニンシンターゼ		C324	はい	未知
THOC1	THO 複合体サブユニット 1	RNA/DNA 結合		C49	はい	未知
TNFAIP3	腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質 3	ユビキチン特異的プロテアーゼ		C54	はい	TCR 媒介性の T 細胞活性化で NF-κB シグナル伝達を阻害する

【０６１８】

【表１８－３】

UBR4	E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ	ユビキチンリガーゼ		C2554	はい	未知
USP7	ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7	ユビキチン特異的プロテアーゼ		C315	はい	FOXP3 を脱ユビキチン化し、Treg 抑制能力を増大させる
VDAC3	電位依存性アニオン選択的チャネルタンパク質	ミトコンドリア外膜チャネル		C65	はい	未知
VDAC3	電位依存性アニオン選択的チャネル タンパク質	電位開口型アニオンチャネル		C36	はい	未知
ZC3HAV1	ジンクフィンガー CCCH 型抗ウイルスタンパク質 1	ポリ(A) RNA 結合		C645	はい	ウイルス複製を阻害する
ZNF346	ジンクフィンガー タンパク質 346	RNA 結合		C68	はい	未知
AARS	アラニン--tRNA リガーゼ, 細胞質	アラニン-tRNA リガーゼ		C773	いいえ	未知
APOBEC3C	高可能性 DNA dC- dU 編集酵素	シチジンデアミナーゼ		C130	いいえ	レトロウイルス複製を阻害する
BCL2A1	Bcl-2 関連のタンパク質 A1	足場タンパク質		C55	いいえ	発現が炎症サイトカインによって誘発される
BCL2A1	Bcl-2 関連のタンパク質 A1	足場タンパク質		C19	いいえ	未知
CHRAC1	クロマチンアクセシビリティ複合タンパク質 1	クロマチンリモデリング		C55	いいえ	未知
DCXR	L-キシルロースレダクターゼ	キシルロースレダクターゼ		C244	いいえ	未知
GHDC	GH3 ドメイン含有タンパク質	特徴づけられていない		C502	いいえ	未知
IRAK4	インターロイキン-1 受容体関連のキナーゼ 4	セリン/トレオニン タンパク質 キナーゼ		C13	いいえ	TLR 活性化で IRAK1 の脱ユビキチン化を促進することによって自然免疫反応の開始を助ける。また、T 細胞活性化に関係する。
NADSYN1	グルタミン依存性の NAD(+) シンテターゼ	NAD(+) シンターゼ		C428	いいえ	未知

【０６１９】

【表１８－４】

PGLS	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	6-ホスホグルコノラクトンの加水分解		C32	いいえ	未知
PRKDC	DNA依存性のタンパク質キナーゼ触媒サブユニット	セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ		C4045	いいえ	V(D)J組換えに関係するDNA損傷応答を制御する
PUSL1	tRNAプソイドウリジンシンターゼ様1	プソイドウリジンシンターゼ		C292	いいえ	未知
RIN3	Ras and Rab相互作用物質3	ＧＴＰアーゼ活性化因子		C942	いいえ	未知
SCLY	セレノシステインリアーゼ	セレノシステインリアーゼ		C22	いいえ	未知
SPCS2	シグナルペプチダーゼ複合体サブユニット2	ペプチダーゼ		C17	いいえ	未知
TRNT1	CCA tRNAヌクレオチジルトランスフェラーゼ1, ミトコンドリア	tRNA結合		C373	いいえ	突然変異はB細胞免疫不全に加えて、T及びNK細胞の漸減につながる(OMIMナンバー616084)
TUBGCP3	ガンマ-チューブリン複合成分3	ガンマ-チューブリン結合		C194	いいえ	未知
UBE2L6	ユビキチン/ISG15結合酵素E2 L6	ユビキチン結合酵素		C98	いいえ	IFN誘導ユビキチン様タンパク質に対するE2酵素として作用する

【０６２０】

表８はヒトＴ細胞標的におけるＤＭＦ感受性システイン含有タンパク質の例示的なリストを示す。表８はさらに、タンパク質の受入番号（またはタンパク質識別子）を示す。

【０６２１】

【表１９－１】
表８

識別子	タンパク質名	SEQ ID NO:	DMF_50uM_4h	DMF_50uM_2h	DMF_50uM_1h	DMF_25uM_4h	DMF_10uM_4h	MMF_50uM_4h
Q9NRW3_C130	APOBEC3C 高可能性 DNA dC-dU 編集酵素 APOBEC-3C	805	20	20	8.6	--	1.92	1.48
Q9NWZ3_C13	IRAK4 インターロイキン-1 受容体関連のキナーゼ 4	806	20	--	8.3	--	--	1.48
Q9Y2W6_C109	TDRKH Tudor および KH ドメイン含有タンパク質	807	20	20	4	--	2.34	1.36
Q6IA69_C428	NADSYN1 グルタミン依存性の NAD(+) シンテターゼ	808	20	2.31	1.81	--	1.43	1.33
O14920_C464	核因子カッパ-B キナーゼサブユニットの IKBKB 阻害剤	809	20	10.12	3.96	--	2.59	--
P00813_C75	ADA アデノシンデアミナーゼ	810	20	5.08	2.51	--	2.29	--
Q9Y277_C65	VDAC3 電位依存性アニオン選択的チャネルタンパク質	811	15.94	7.53	3.35	5.64	1.73	1.39
P49588_C773	AARS アラニン--tRNA リガーゼ, 細胞質	812	12.75	10.16	9.34	--	2.84	1.24
O14933_C98	UBE2L6 ユビキチン/ISG15 結合酵素 E2 L6	813	12.55	2.92	2.44	--	1.49	1.7
O95336_C32	PGLS 6-ホスホグルコノラクトナーゼ	814	11.51	9.49	3.42	5.32	1.9	1.26
A6NDG6_C297	PGP ホスホグリコール酸ホスファターゼ	815	10.77	4.21	3.06	--	--	1.52
Q7Z6Z7_C3372	HUWE1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ HUWE1	816	10.48	4.43	2.28	--	1.58	1.2
Q16548_C55	BCL2A1 Bcl-2 関連のタンパク質 A1	817	7.18	--	--	--	--	0.97
P11216_C326	PYGB グリコーゲンホスホリラーゼ, 脳型	818	6.76	3.73	2.47	3.53	1.65	1.29
O95081_C39	AGFG2 Arf-GAP ドメインおよび FG リピート含有タンパク質 2	819	6.39	3.85	--	--	1.42	1.24
Q7Z2W4_C645	ZC3HAV1 ジンクフィンガー CCCH 型抗ウイルス タンパク質 1	820	6.28	3.13	2.36	2.52	1.46	1.3
O00170_C122	AIP AH 受容体共役タンパク質	821	6.14	3.05	--	--	--	1.24
Q96Q11_C373	TRNT1 CCA tRNA ヌクレオチジルトランスフェラーゼ 1, ミトコンドリア	822	5.83	2.66	1.97	--	--	1.29
Q8TB24_C942	RIN3 Ras および Rab 相互作用物質 3	823	5.7	3	--	--	--	1.23
Q9Y4W2_C456	LAS1L リボソーム生成タンパク質 LAS1L	824	5.61	3.42	1.8	--	1.29	1.14
Q02556_C306	IRF8 インターフェロン調節因子 8	825	5.32	--	1.66	--	1.9	--
Q96GW9_C425	MARS2 メチオニン--tRNA リガーゼ, ミトコンドリア .A	826	5.3	4.16	2.23	2.86	1.84	1.3

【０６２２】

【表１９－２】

Q15306_C194	IRF4 インターフェロン調節因子 4	827	5.25	3.13	1.32	1.78	1.69	1.33
Q15005_C17	SPCS2 シグナルペプチダーゼ複合体サブユニット 2	828	5.09	3.86	2.25	2.41	1.42	1.32
P54136_C32	RARS アルギニン--tRNA リガーゼ, 細胞質	829	5.02	3.58	2.58	4.03	0.62	1.78
Q96CW5_C194	TUBGCP3 ガンマ-チューブリン複合成分3	830	4.94	2.44	--	--	--	--
P46109_C249	CRKL Crk 様タンパク質	831	4.86	3.21	2.21	--	1.38	1.27
Q8N0Z8_C292	PUSL1 tRNAプソイドウリジンシンターゼ様 1	832	4.68	--	--	--	--	1.36
Q5T4S7_C2554	UBR4 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ UBR4	833	4.63	2.1	1.6	--	1.52	1.2
Q9UL40_C68	ZNF346 ジンクフィンガー タンパク質 346	834	4.6	3.91	2.5	--	1.98	1.26
Q13045_C46	FLII タンパク質 flightless-1 相同体	835	4.5	3.57	2.05	--	1.55	1.27
Q86YS7_C993	KIAA0528 特徴づけられていない タンパク質 KIAA0528	836	4.38	--	--	--	1.4	1.4
Q9Y6C9_C296	MTCH2 ミトコンドリア担体相同体 2	837	4.3	2.44	1.81	--	1.68	1.35
Q7Z4W1_C244	DCXR L-キシルロースレダクターゼ	838	4.24	2.76	1.29	--	2.3	--
Q04759_C14	PRKCQ タンパク質 キナーゼ C シータ型	839	4.21	2.92	--	3.29	1.62	1.14
P18583_C92	SON タンパク質 SON	840	4.17	6.31	2.5	--	--	1.31
P31153_C56	MAT2A S-アデノシルメチオニン シンターゼアイソフォーム型-2	841	4.17	--	--	--	--	--
Q16548_C19	BCL2A1 Bcl-2 関連のタンパク質 A1	842	4.16	2.09	--	2.19	1.15	1.28
Q14005_C1004	IL16 プロインターロイキン-16	843	4.13	3.32	1.95	--	1.37	1.31
P31153_C104	MAT2A S-アデノシルメチオニン シンターゼアイソフォーム型-2	844	4.11	--	--	--	1.5	1.31
Q9Y277_C36	VDAC3 電位依存性アニオン選択的チャネル タンパク質	845	4.11	3.98	3.21	--	--	1.18
Q8WXH0_C553	SYNE2 Nesprin-2	846	4.05	3.29	--	--	1.61	--
Q96I15_C22	SCLY セレノシステインリアーゼ	847	4.04	2.16	1.9	2.16	1.31	1.27
P29590_C479	PML タンパク質 PML	848	--	4.57	--	2.17	2.1	1.27
Q8IYQ7_C324	THNSL1 トレオニンシンターゼ様 1	849	--	19.36	15.93	--	--	1.4
Q93009_C315	USP7 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7	850	--	14.06	5.33	--	1.9	1.4

【０６２３】

【表１９－３】

P21580_C54	TNFAIP3 腫瘍壊死因子アルファ誘導タンパク質 3	851	--	5.34	--	--	1.58	--
O14976_C87	GAK サイクリン-G 関連のキナーゼ	852	--	4.79	--	--	1.36	--
Q96FV9_C49	THOC1 THO 複合体サブユニット 1	853	--	5.7	3.93	--	--	0.97
P78527_C4045	PRKDC DNA 依存性のタンパク質 キナーゼ触媒サブユニット	854	--	10.53	4.14	--	--	1.23
Q9NRG0_C55	CHRAC1 クロマチンアクセシビリティ複合タンパク質 1	855	--	11.72	12.59	--	5.07	1.27
Q8N2G8_C502	GHDC GH3 ドメイン含有タンパク質	856	--	20	4.23	--	--	--

【０６２４】

表９は本明細書中に記載された例示的なシステイン含有タンパク質の全タンパク質配列を示す。対象のシステイン残基には＊が付されている。

【０６２５】

【表２０－１】
表９

タンパク質識別子（受入番号）	タンパク質名	システイン残基番号	配列	SEQ ID NO:
O75874	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ１(IDH1)	C269	MSKKISGGSV VEMQGDEMTR IIWELIKEKL IFPYVELDLH SYDLGIENRD ATNDQVTKDA AEAIKKHNVG VKCATITPDE KRVEEFKLKQ MWKSPNGTIR NILGGTVFRE AIICKNIPRL VSGWVKPIII GRHAYGDQYR ATDFVVPGPG KVEITYTPSD GTQKVTYLVH NFEEGGGVAM GMYNQDKSIE DFAHSSFQMA LSKGWPLYLS TKNTILKKYD GRFKDIFQEI YDKQYKSQFE AQKIWYEHRL IDDMVAQAMK SEGGFIWA**C***K NYDGDVQSDS VAQGYGSLGM MTSVLVCPDG KTVEAEAAHG TVTRHYRMYQ KGQETSTNPI ASIFAWTRGL AHRAKLDNNK ELAFFANALE EVSIETIEAG FMTKDLAACI KGLPNVQRSD YLNTFEFMDK LGENLKIKLA QAKL	1
P48735	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ２(IDH2)	C308	MAGYLRVVRS LCRASGSRPA WAPAALTAPT SQEQPRRHYA DKRIKVAKPV VEMDGDEMTR IIWQFIKEKL ILPHVDIQLK YFDLGLPNRD QTDDQVTIDS ALATQKYSVA VKCATITPDE ARVEEFKLKK MWKSPNGTIR NILGGTVFRE PIICKNIPRL VPGWTKPITI GRHAHGDQYK ATDFVADRAG TFKMVFTPKD GSGVKEWEVY NFPAGGVGMG MYNTDESISG FAHSCFQYAI QKKWPLYMST KNTILKAYDG RFKDIFQEIF DKHYKTDFDK NKIWYEHRLI DDMVAQVLKS SGGFVWA**C***KN YDGDVQSDIL AQGFGSLGLM TSVLVCPDGK TIEAEAAHGT VTRHYREHQK GRPTSTNPIA SIFAWTRGLE HRGKLDGNQD LIRFAQMLEK VCVETVESGA MTKDLAGCIH GLSNVKLNEH FLNTTDFLDT IKSNLDRALG RQ	2

【０６２６】

【表２０－２】

Q14790	CASP8	C360	MDFSRNLYDI GEQLDSEDLA SLKFLSLDYI PQRKQEPIKD ALMLFQRLQE KRMLEESNLS FLKELLFRIN RLDLLITYLN TRKEEMEREL QTPGRAQISA YRVMLYQISE EVSRSELRSF KFLLQEEISK CKLDDDMNLL DIFIEMEKRV ILGEGKLDIL KRVCAQINKS LLKIINDYEE FSKERSSSLE GSPDEFSNGE ELCGVMTISD SPREQDSESQ TLDKVYQMKS KPRGYCLIIN NHNFAKAREK VPKLHSIRDR NGTHLDAGAL TTTFEELHFE IKPHDDCTVE QIYEILKIYQ LMDHSNMDCF ICCILSHGDK GIIYGTDGQE APIYELTSQF TGLKCPSLAG KPKVFFIQA**C*** QGDNYQKGIP VETDSEEQPY LEMDLSSPQT RYIPDEADFL LGMATVNNCV SYRNPAEGTW YIQSLCQSLR ERCPRGDDIL TILTEVNYEV SNKDDKKNMG KQMPQPTFTL RKKLVFPSD	3
Q92851	CASP10	C401	MKSQGQHWYS SSDKNCKVSF REKLLIIDSN LGVQDVENLK FLCIGLVPNKKLEKSSSASD VFEHLLAEDL LSEEDPFFLA ELLYIIRQKK LLQHLNCTKE EVERLLPTRQ RVSLFRNLLY ELSEGIDSEN LKDMIFLLKD SLPKTEMTSL SFLAFLEKQG KIDEDNLTCL EDLCKTVVPK LLRNIEKYKR EKAIQIVTPP VDKEAESYQG EEELVSQTDV KTFLEALPQE SWQNKHAGSN GNRATNGAPS LVSRGMQGAS ANTLNSETST KRAAVYRMNR NHRGLCVIVN NHSFTSLKDR QGTHKDAEIL SHVFQWLGFT VHIHNNVTKV EMEMVLQKQK CNPAHADGDC FVFCILTHGR FGAVYSSDEA LIPIREIMSH FTALQCPRLA EKPKLFFIQA **C*** QGEEIQPSV SIEADALNPE QAPTSLQDSI PAEADFLLGL ATVPGYVSFR HVEEGSWYIQ SLCNHLKKLV PRMLKFLEKT MEIRGRKRTV WGAKQISATS LPTAISAQTP RPPMRRWSSV S	4

【０６２７】

【表２０－３】

Q99873	PRMT1	C109	MENFVATLAN GMSLQPPLEE VSCGQAESSE KPNAEDMTSK DYYFDSYAHF GIHEEMLKDE VRTLTYRNSM FHNRHLFKDK VVLDVGSGTG ILCMFAAKAG ARKVIGIE**C*** S SISDYAVKIV KANKLDHVVT IIKGKVEEVE LPVEKVDIII SEWMGYCLFY ESMLNTVLYA RDKWLAPDGL IFPDRATLYV TAIEDRQYKD YKIHWWENVY GFDMSCIKDV AIKEPLVDVV DPKQLVTNAC LIKEVDIYTV KVEDLTFTSP FCLQVKRNDY VHALVAYFNI EFTRCHKRTG FSTSPESPYT HWKQTVFYME DYLTVKTGEE IFGTIGMRPN AKNNRDLDFT IDLDFKGQLC ELSCSTDYRM R	5
Q9NYL2	MAP3 キナーゼ MLTK (又は ZAK)	C22	MSSLGASFVQ IKFDDLQFFE N**C***GGGSFGSV YRAKWISQDK EVAVKKLLKI EKEAEILSVL SHRNIIQFYG VILEPPNYGI VTEYASLGSL YDYINSNRSE EMDMDHIMTW ATDVAKGMHY LHMEAPVKVI HRDLKSRNVV IAADGVLKIC DFGASRFHNH TTHMSLVGTF PWMAPEVIQS LPVSETCDTY SYGVVLWEML TREVPFKGLE GLQVAWLVVE KNERLTIPSS CPRSFAELLH QCWEADAKKR PSFKQIISIL ESMSNDTSLP DKCNSFLHNK AEWRCEIEAT LERLKKLERD LSFKEQELKE RERRLKMWEQ KLTEQSNTPL LPSFEIGAWT EDDVYCWVQQ LVRKGDSSAE MSVYASLFKE NNITGKRLLL LEEEDLKDMG IVSKGHIIHF KSAIEKLTHD YINLFHFPPL IKDSGGEPEE NEEKIVNLEL VFGFHLKPGT GPQDCKWKMY MEMDGDEIAI TYIKDVTFNT NLPDAEILKM TKPPFVMEKW IVGIAKSQTV ECTVTYESDV RTPKSTKHVH SIQWSRTKPQ DEVKAVQLAI QTLFTNSDGN PGSRSDSSAD CQWLDTLRMR QIASNTSLQR SQSNPILGSP FFSHFDGQDS YAAAVRRPQV PIKYQQITPV NQSRSSSPTQ YGLTKNFSSL	6

【０６２８】

【表２０－４】

			HLNSRDSGFS SGNTDTSSER GRYSDRSRNK YGRGSISLNS SPRGRYSGKS QHSTPSRGRY PGKFYRVSQS ALNPHQSPDF KRSPRDLHQP NTIPGMPLHP ETDSRASEED SKVSEGGWTK VEYRKKPHRP SPAKTNKERA RGDHRGWRNF	
P12268	IMPDH2	C140, C331	MADYLISGGT SYVPDDGLTA QQLFNCGDGL TYNDFLILPG YIDFTADQVD LTSALTKKIT LKTPLVSSPM DTVTEAGMAI AMALTGGIGF IHHNCTPEFQ ANEVRKVKKY EQGFITDPVV LSPKDRVRDV FEAKARHGF**C*** GIPITDTGRM GSRLVGIISS RDIDFLKEEE HDCFLEEIMT KREDLVVAPA GITLKEANEI LQRSKKGKLP IVNEDDELVA IIARTDLKKN RDYPLASKDA KKQLLCGAAI GTHEDDKYRL DLLAQAGVDV VVLDSSQGNS IFQINMIKYI KDKYPNLQVI GGNVVTAAQA KNLIDAGVDA LRVGMGSGSI **C***ITQEVLACG RPQATAVYKV SEYARRFGVP VIADGGIQNV GHIAKALALG ASTVMMGSLL AATTEAPGEY FFSDGIRLKK YRGMGSLDAM DKHLSSQNRY FSEADKIKVA QGVSGAVQDK GSIHKFVPYL IAGIQHSCQD IGAKSLTQVR AMMYSGELKF EKRTSSAQVE GGVHSLHSYE KRLF	7
Q9NQ88	TIGAR	C114, C161	MARFALTVVR HGETRFNKEK IIQGQGVDEP LSETGFKQAA AAGIFLNNVK FTHAFSSDLM RTKQTMHGIL ERSKFCKDMT VKYDSRLRER KYGVVEGKAL SELRAMAKAA REE**C***PVFTPP GGETLDQVKM RGIDFFEFLC QLILKEADQK EQFSQGSPSN **C***LETSLAEIF PLGKNHSSKV NSDSGIPGLA ASVLVVSHGA YMRSLFDYFL TDLKCSLPAT LSRSELMSVT PNTGMSLFII NFEEGREVKP TVQCICMNLQ DHLNGLTETR	8

【０６２９】

【表２０－５】

Q04759	PKCθ	C14, C17	MSPFLRIGLS NFDC*GSC*QSC QGEAVNPYCA VLVKEYVESE NGQMYIQKKP TMYPPWDSTF DAHINKGRVM QIIVKGKNVD LISETTVELY SLAERCRKNN GKTEIWLELK PQGRMLMNAR YFLEMSDTKD MNEFETEGFF ALHQRRGAIK QAKVHHVKCH EFTATFFPQP TFCSVCHEFV WGLNKQGYQC RQCNAAIHKK CIDKVIAKCT GSAINSRETM FHKERFKIDM PHRFKVYNYK SPTFCEHCGT LLWGLARQGL KCDACGMNVH HRCQTKVANL CGINQKLMAE ALAMIESTQQ ARCLRDTEQI FREGPVEIGL PCSIKNEARP PCLPTPGKRE PQGISWESPL DEVDKMCHLP EPELNKERPS LQIKLKIEDF ILHKMLGKGS FGKVFLAEFK KTNQFFAIKA LKKDVVLMDD DVECTMVEKR VLSLAWEHPF LTHMFCTFQT KENLFFVMEY LNGGDLMYHI QSCHKFDLSR ATFYAAEIIL GLQFLHSKGI VYRDLKLDNI LLDKDGHIKI ADFGMCKENM LGDAKTNTFC GTPDYIAPEI LLGQKYNHSV DWWSFGVLLY EMLIGQSPFH GQDEEELFHS IRMDNPFYPR WLEKEAKDLL VKLFVREPEK RLGVRGDIRQ HPLFREINWE ELERKEIDPP FRPKVKSPFD CSNFDKEFLN EKPRLSFADR ALINSMDQNM FRNFSFMNPG MERLIS	9

【０６３０】

表１０Ａ－１０Ｅはシステイン含有タンパク質、およびタンパク質の種類によって分けられた、潜在的な結合のシステイン部位のリストを示す。表１０Ａはシステイン含有酵素および潜在的なシステイン結合部位を示す。表１０Ｂはシステイン含有転写因子および制御因子のリストを示す。表１０Ｃはシステイン含有のチャネル、輸送体、および受容体の例示的なリストを示す。表１０Ｄは例示的なシステイン含有のアダプター、足場、および修飾因子のタンパク質を示す。表１０Ｅは未分類のシステイン含有タンパク質の例示的なリストを示す。

【０６３１】

【表２１－１】
表１０Ａ

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
O14920	核因子カッパ-B キナーゼ サブユニットの IKBKB 阻害剤	C464	酵素
O14933	UBE2L6 ユビキチン/ISG15 結合酵素 E2 L6 PCTK	C98	酵素
O94953	KDM4B リジン特異的デメチラーゼ 4B	C694	酵素
P00813	ADA アデノシンデアミナーゼ	C75	酵素
P09211	GSTP1 グルタチオン S-トランスフェラーゼ P	C48	酵素
P15374	UCHL3 ユビキチンカルボキシル-末端ヒドロラーゼアイソザイム L3	C95	酵素
P16455	MGMT メチル化-DNA--タンパク質-システインメチルトランスフェラーゼ	C145; C150	酵素
P17812	CTP シンターゼ 1	C491	酵素
P19447	ERCC3 TFIIH 基本転写因子複合体ヘリカーゼ	C342	酵素
P21580	TNFAIP3 腫瘍壊死因子 アルファ誘導タンパク質 3	C54	酵素
P24752	ミトコンドリア、ACAT1 アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	C119; C126; C196; C413	酵素
P40261	ニコチンアミド N-メチルトランスフェラーゼ	C165	酵素
P41226	UBA7 ユビキチン様修飾酵素活性化酵素 7	C599	酵素
P42575	CASP2 カスパーゼ-2	C370	酵素
P43403	ZAP70 チロシン-タンパク質キナーゼ ZAP-70	C117	酵素
P48735	IDH2 イソクエン酸デヒドロゲナーゼ	C308	酵素
P51617	IRAK1 インターロイキン-1 受容体関連の キナーゼ 1	C608	酵素
P61081	NEDD8 結合酵素 Ubc12	C47	酵素
P61088	ユビキチン結合酵素 E2 N	C87	酵素
P68036	UBE2L3 ユビキチン結合酵素 E2 L3	C86	酵素
Q00535	CDK5 サイクリン依存性キナーゼ 5	C157	酵素
Q04759	PRKCQ タンパク質 キナーゼ C シータ型	C14; C17	酵素
Q06124	チロシン-プロテインフォスファターゼ非受容体型 11	C573	酵素
Q09472	EP300 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300	C1738	酵素
Q14790	CASP8 カスパーゼ-8	C360	酵素
Q15084	PDIA6 タンパク質 ジスルフィド-イソメラーゼ A6	C55; C58; C190; C193	酵素
Q15910	EZH2 ヒストン-リシン N-メチルトランスフェラーゼ EZH2	C503	酵素
Q16763	UBE2S ユビキチン結合酵素 E2 S	C118	酵素
Q16822	PCK2 ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	C306	酵素
Q16875	6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ 3	C155	酵素
Q16877	PFKFB4 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファ	C159	酵素

【０６３２】

【表２１－２】

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
	ターゼ		
Q6L8Q7	PDE12 2,5-ホスホジエステラーゼ 12	C108	酵素
Q70CQ2	USP34 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 34	C741; C1090	酵素
Q86UV5	USP48 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 48	C39	酵素
Q92851	カスパーゼ-10	C401	酵素
Q93009	USP7 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7	C223; C315	酵素
Q96FA3	PELI1 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ ペリノ相同体 1	C282	酵素
Q96JH7	VCPIP1 脱ユビキチン化タンパク質 VCIP135	C219	酵素
Q96RU2	USP28 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 28	C171; C733	酵素
Q99873	PRMT1 タンパク質アルギニン N-メチルトランスフェラーゼ	C109	酵素
Q9C0C9	UBE2O ユビキチン結合酵素 E2 O	C375	酵素
Q9NRW4	Dual 特異的 ity プロテインフォスファターゼ 22	C124	酵素
Q9NWZ3	IRAK4 インターロイキン-1 受容体関連の キナーゼ 4	C13	酵素
Q9NYL2	MLTK マイトジェン活性化タンパク質 キナーゼ キナーゼ キナーゼ MLT	C22	酵素
Q9UPT9	USP22 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 22	C44; C171	酵素
Q9Y3Z3	SAMHD1 SAM ドメインおよび HD ドメイン含有タンパク質 1	C522	酵素
Q9Y4C1	KDM3A リジン特異的デメチラーゼ 3A	C251	酵素
Q9Y5T5	USP16 ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 16	C205	酵素

【０６３３】

【表２２】
表１０Ｂ

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
O75362	ZNF217 ジンクフィンガータンパク質 217	C286	転写因子および制御因子
P04150	NR3C1 グルココルチコイド受容体	C302; C622	転写因子および制御因子
P09086	POU2F2 POU ドメイン, クラス 2, 転写因子 2	C346	転写因子および制御因子
P40763	STAT3 シグナル伝達性転写因子 3	C259	転写因子および制御因子
P48200	IREB2 鉄応答要素結合タンパク質 2	C137	転写因子および制御因子
Q01201	RELB 転写因子 RelB	C109	転写因子および制御因子
Q02556	IRF8 インターフェロン調節因子 8	C306	転写因子および制御因子
Q15306	IRF4 インターフェロン調節因子 4	C194	転写因子および制御因子
Q7Z2W4	ZC3HAV1 ジンクフィンガー CCCH 型抗ウイルスタンパク質 1	C645	転写因子および制御因子
Q8TAQ2	SMARCC2 SWI/SNF 複合体サブユニット SMARCC2	C145	転写因子および制御因子

【０６３４】
【表２３】
表１０Ｃ

識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
P63244	GNB2L1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質サブユニット ベータ-２様 1	C182	チャネル、輸送体、受容体
Q16186	プロテアソームユビキチン受容体 ADRM1	C88	チャネル、輸送体、受容体
Q9HB90	RRAGC Ras 関連の GTP 結合タンパク質 C	C358; C377	チャネル、輸送体、受容体

【０６３５】

【表２４】
表１０D

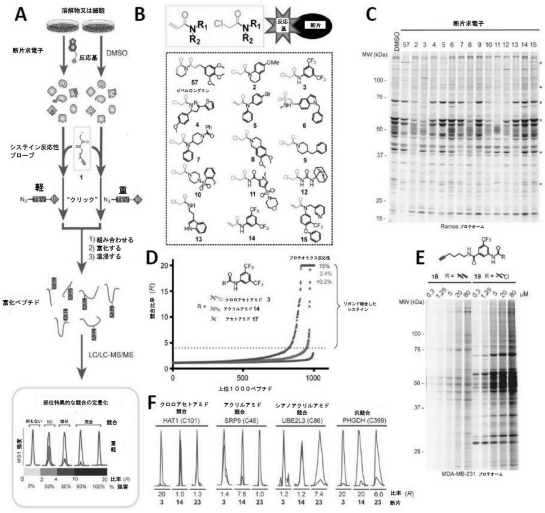
識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
P14598	NCF1 好中球細胞質因子 1	C378	アダプター, 足場, モジュレーターのタンパク質

【０６３６】
【表２５】
表１０Ｅ

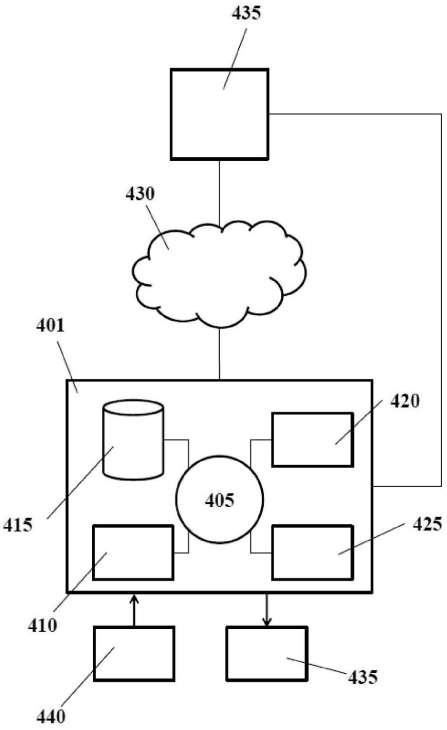
識別子	タンパク質名	システイン位置	タンパク質の種類
O00170	AIP AH 受容体共役タンパク質	C122	未分類
O00541	PES1 Pescadillo 相同体	C272; C361	未分類
O00622	CYR61 タンパク質 CYR61	C39; C70; C134	未分類
O14980	XPO1 エキスポーチン-1	C34; C528; C1070	未分類
P50851	LRBA リポ多糖類反応性およびベージュ様アンカータンパク質	C1704; C2675	未分類
Q96GG9	DCUN1D1 DCN1 様 タンパク質 1	C115	未分類

【０６３７】
本明細書に記載されている実施例および実施例は、例示のみを目的とするものであり、当業者に示唆された様々な修正または変更が本願の精神および範囲内に含まれるべきである。

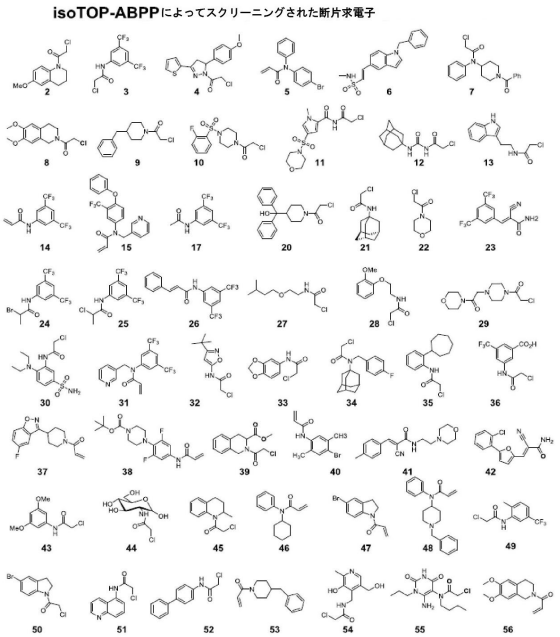
【図１】



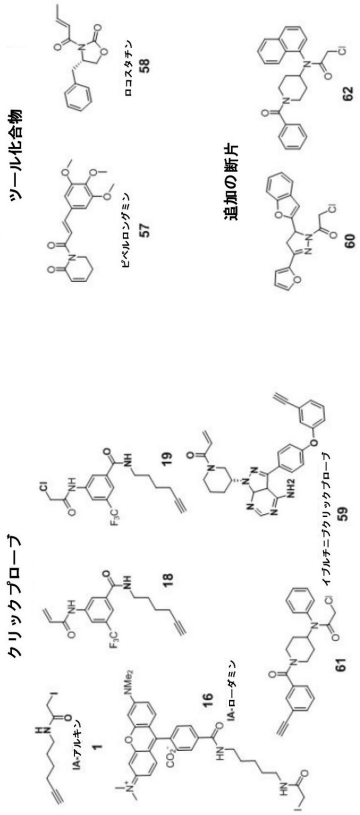
【図２】


435
430
401
420
405
415
425
410
435
440

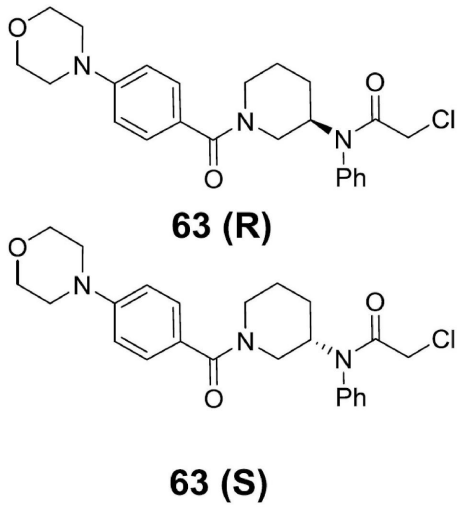
【図３－１】


isoTOP-ABPPによってスクリーニングされた断片求電子

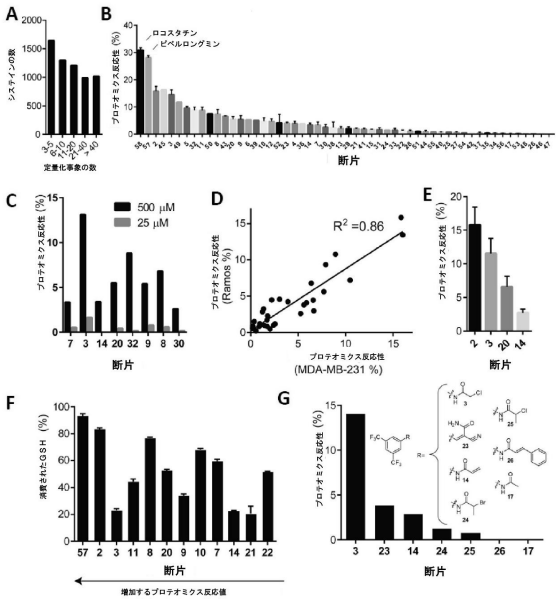
【図３－２】


ツール化合物
ロコスタチン
58
ビベルロンゲミン
57
追加の断片
62
60
クリックプローブ
19
18
IA-アルキン
1
16
IA-ローダミン
イブルチニブクリックプローブ
59
61

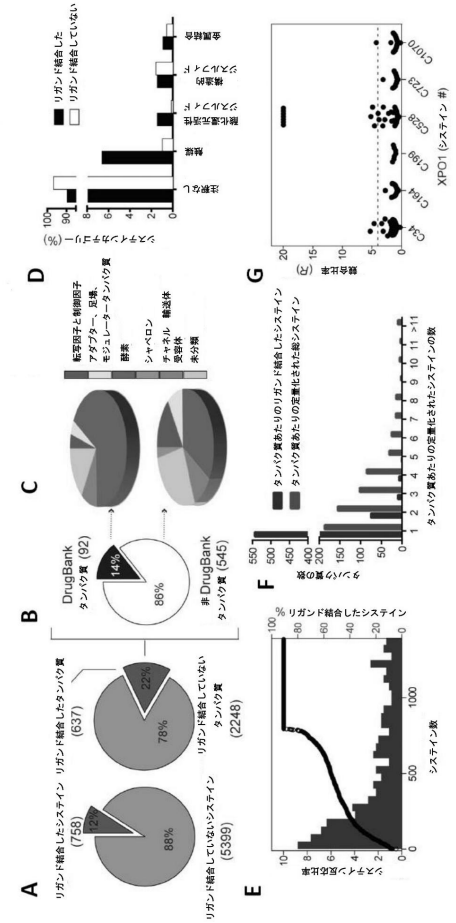
【図３－３】


63 (R)
63 (S)

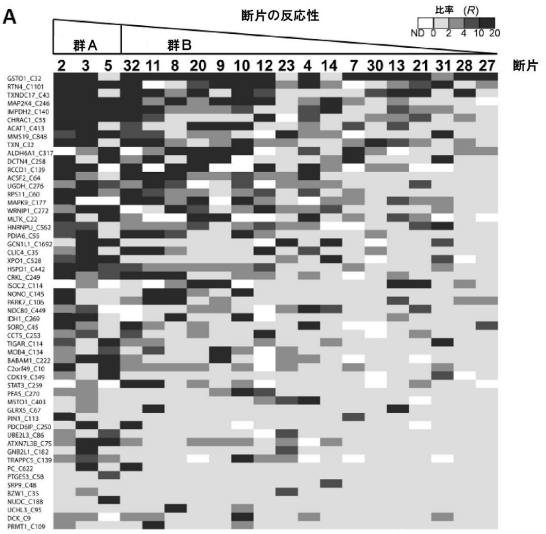
【図４】


A
B
ロコスタチン
ビベルロングミン
C
500 μM
25 μM
D
R2 =0.86
E
F
G
断片
増加するプロテオミクス反応値

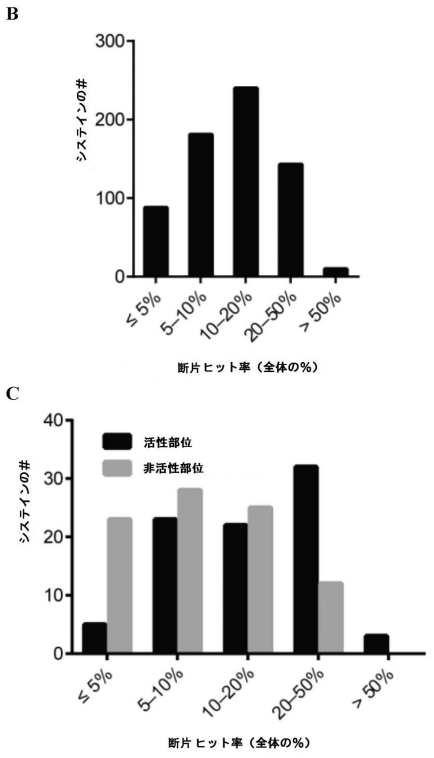
【図５】


A
B
C
D
E
F
G
DrugBank タンパク質 (92)
非DrugBank タンパク質 (545)
リガンド結合したシステイン (758)
リガンド結合していないシステイン (5399)
リガンド結合したタンパク質 (637)
リガンド結合していないタンパク質 (2248)
XPO1 (システイン #)

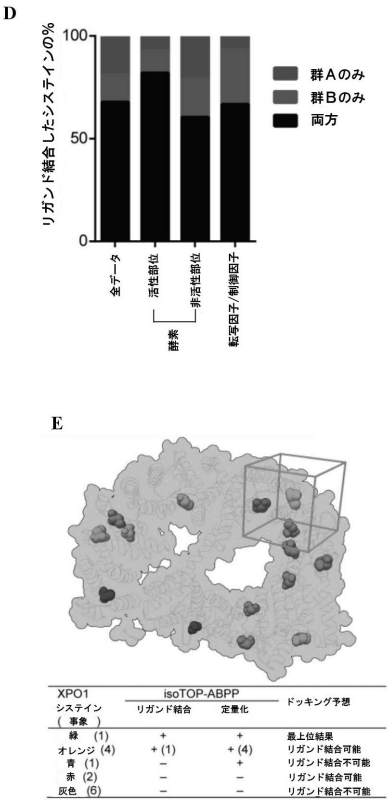
【図６－１】


A
断片の反応性
群A
群B
断片

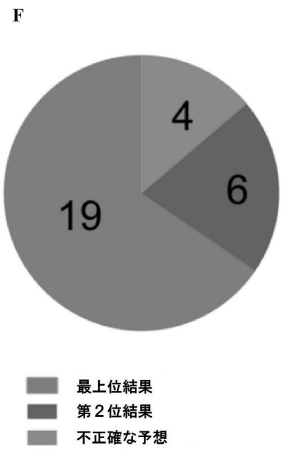
【図６－２】



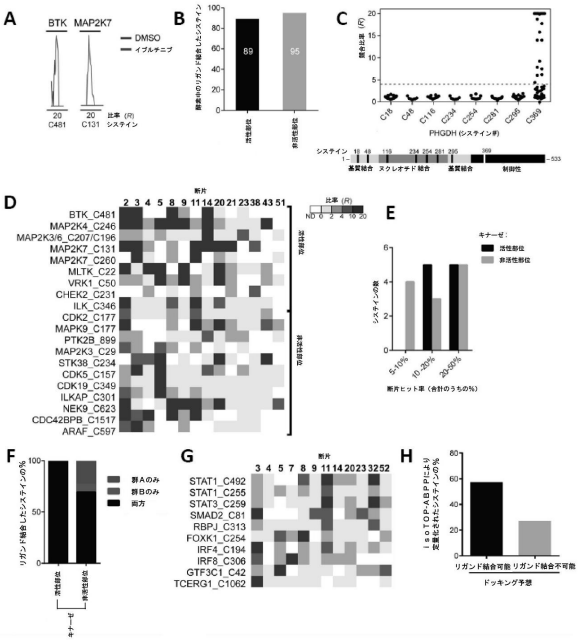
【図６－３】



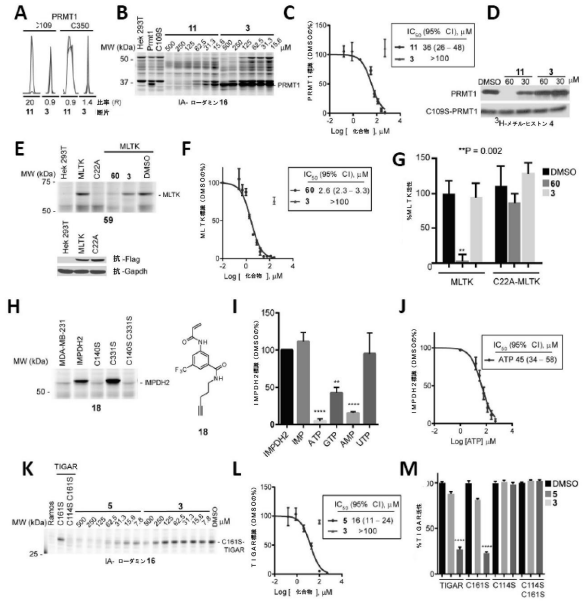
【図６－４】



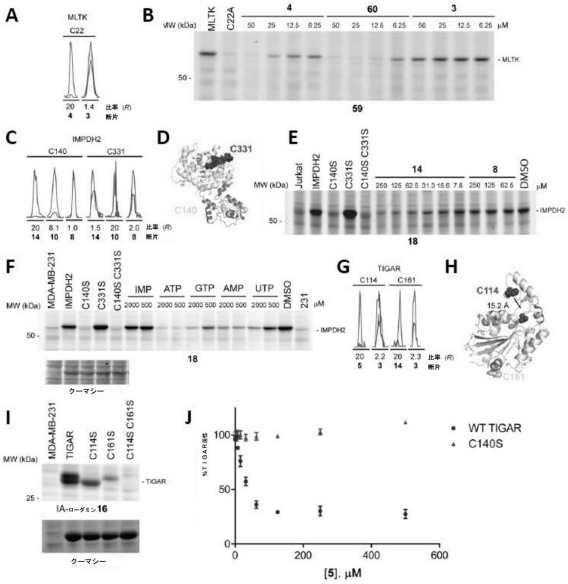
【図７】



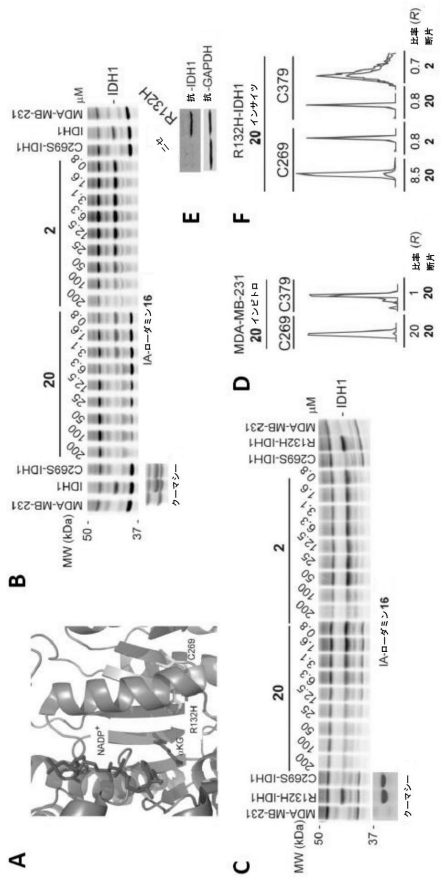
【図８】



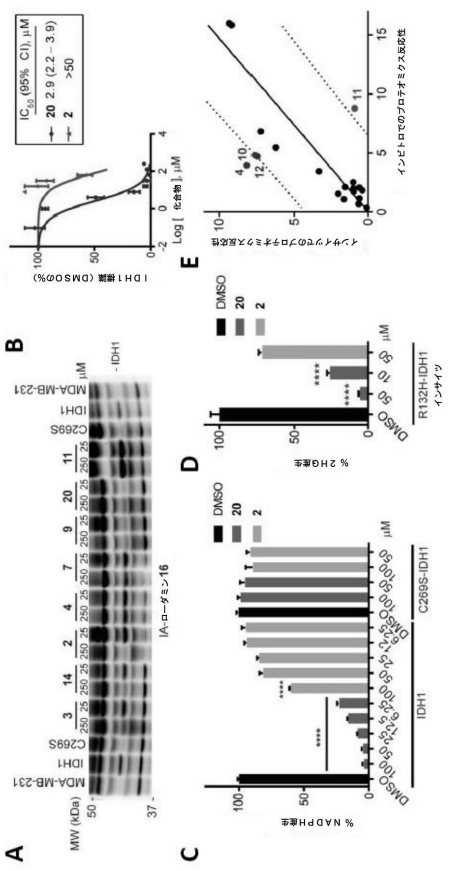
【図９】



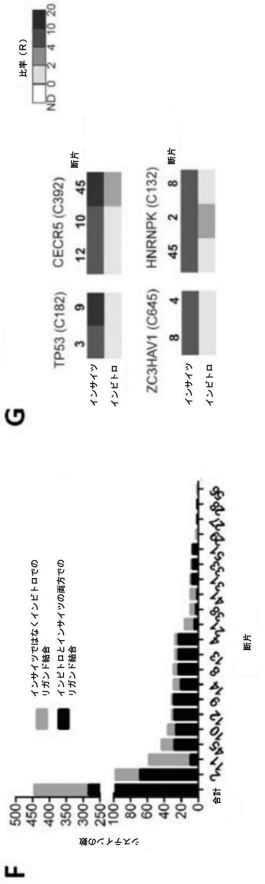
【図１０】



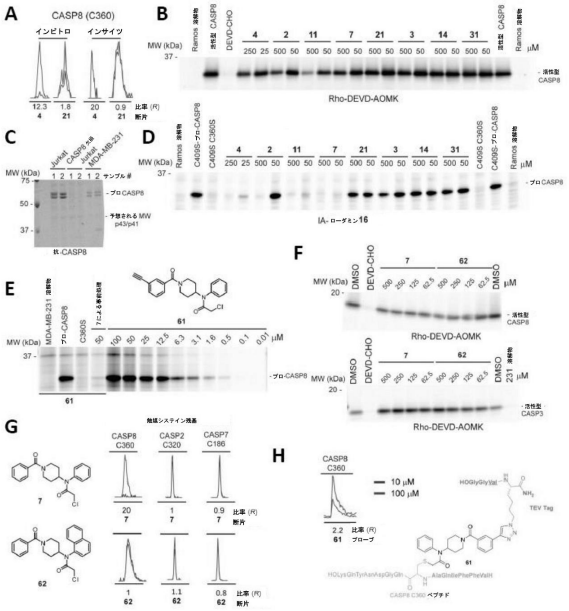
【図１１－１】



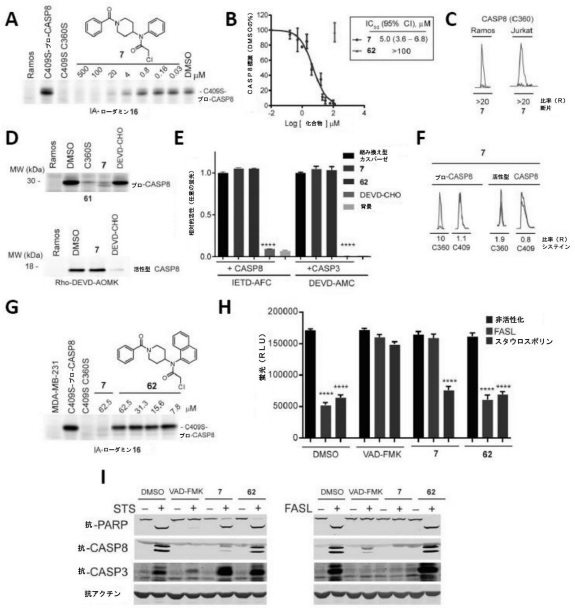
【図１１－２】



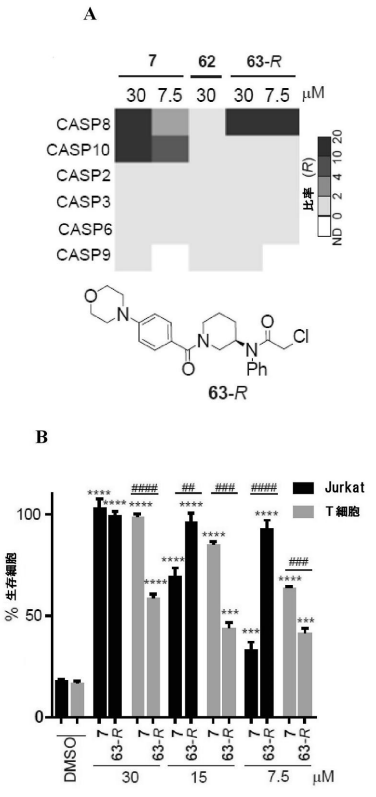
【図１２】



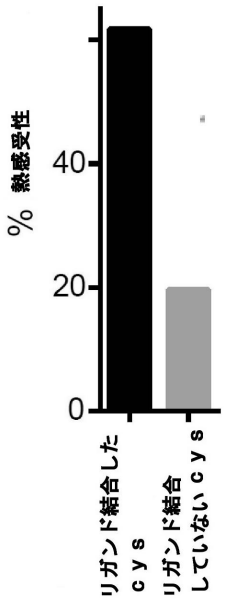
【図１３】



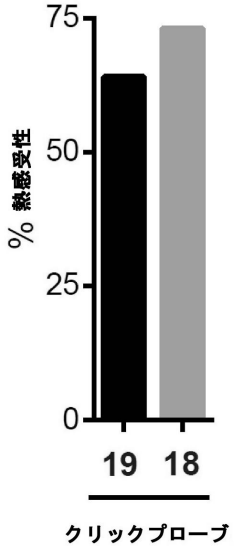
【図１４】



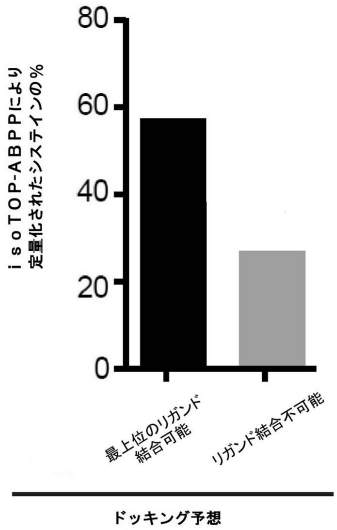
【図１５】



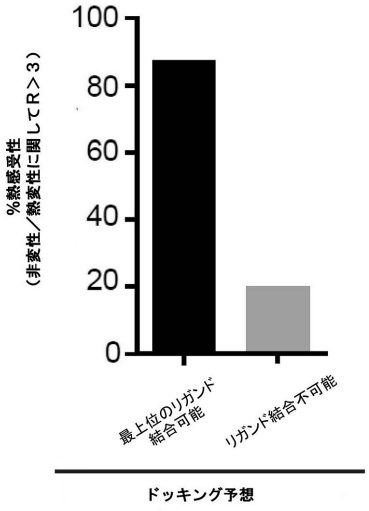
【図１６】



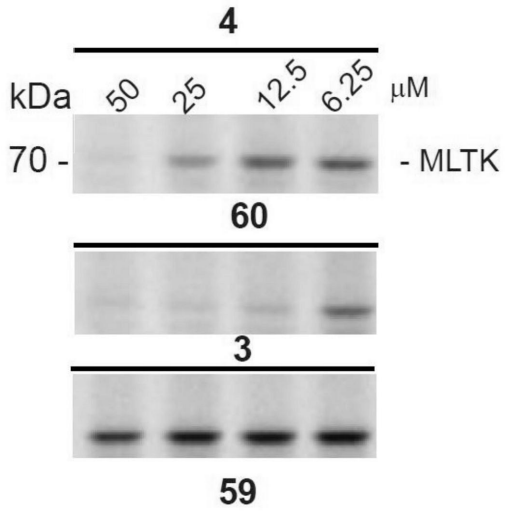
【図１７Ａ】



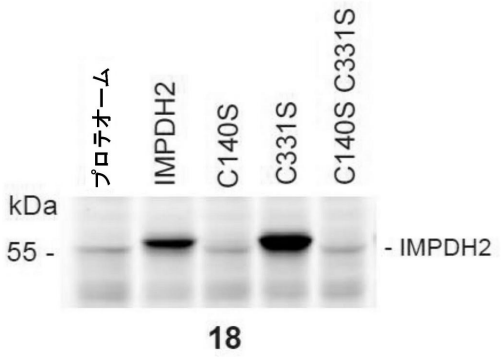
【図１７Ｂ】



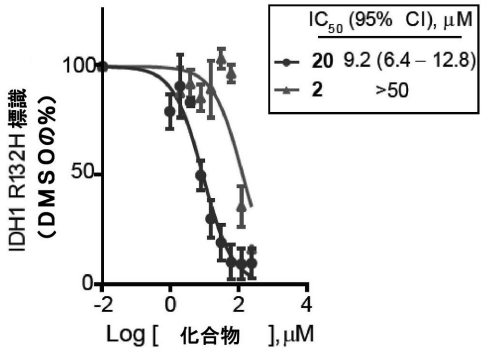
【図１８】



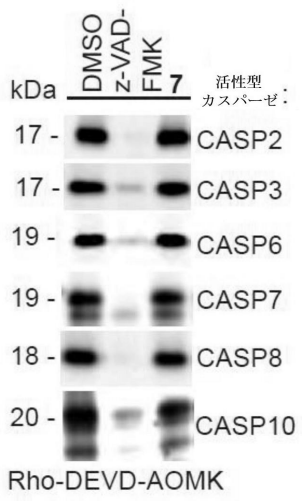
【図１９】



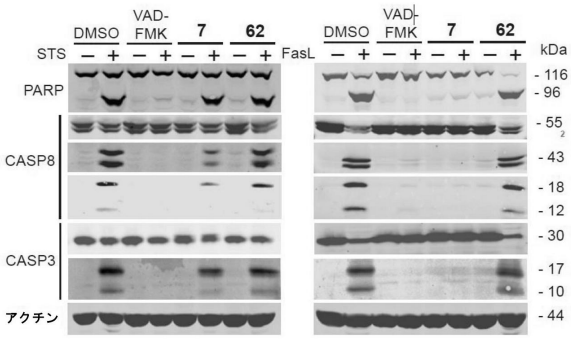
【図２０】



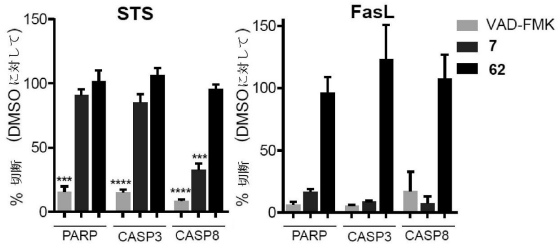
【図２１Ａ】



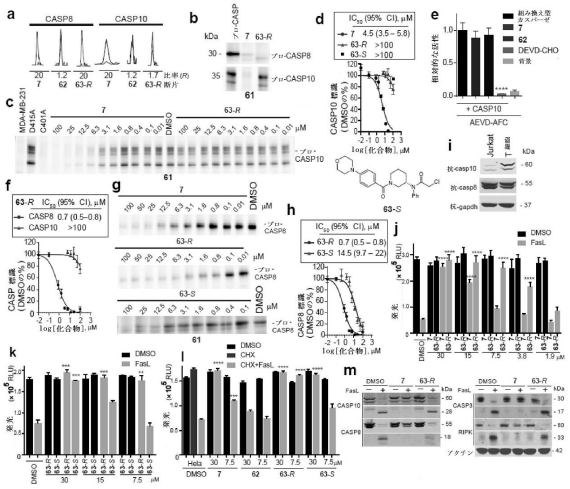
【図２１Ｂ】



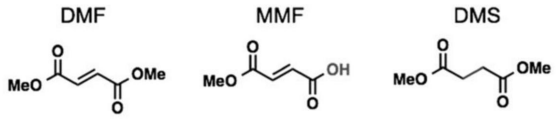
【図２１Ｃ】



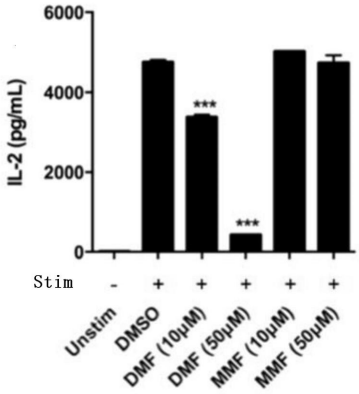
【図２２】



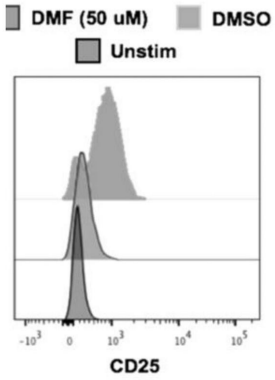
【図２３Ａ】



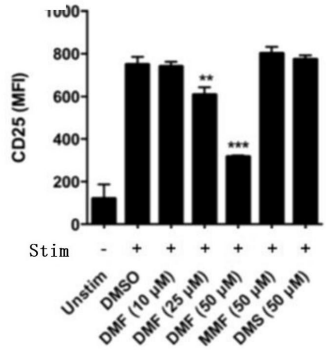
【図２３Ｂ】



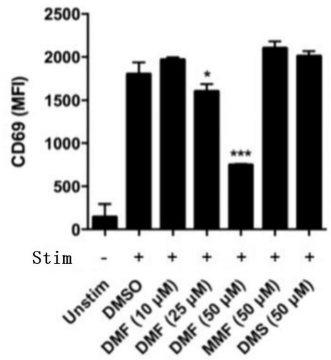
【図２３Ｃ】



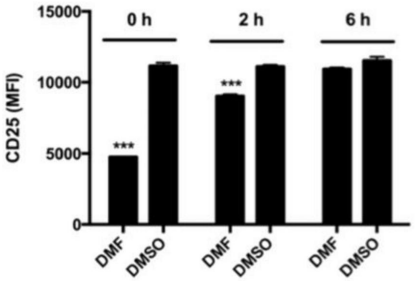
【図２３Ｄ】



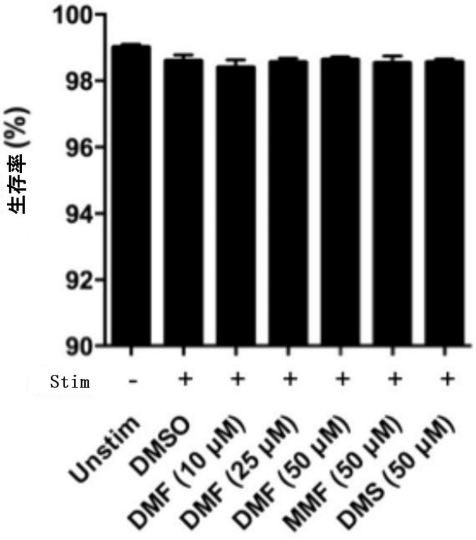
【図２３Ｅ】



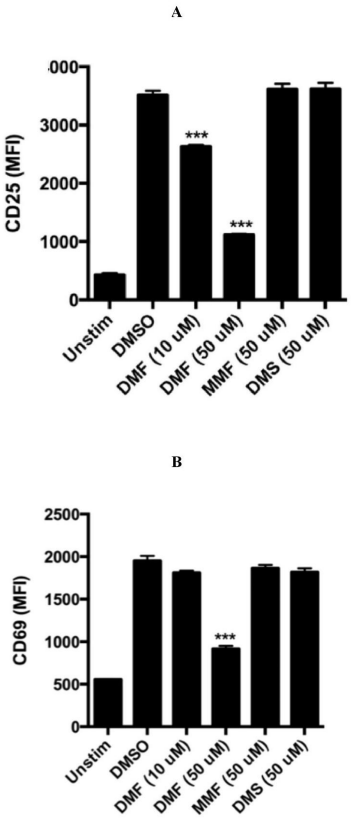
【図２３Ｆ】



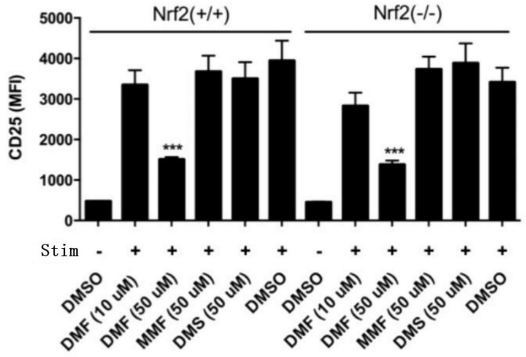
【図２４】



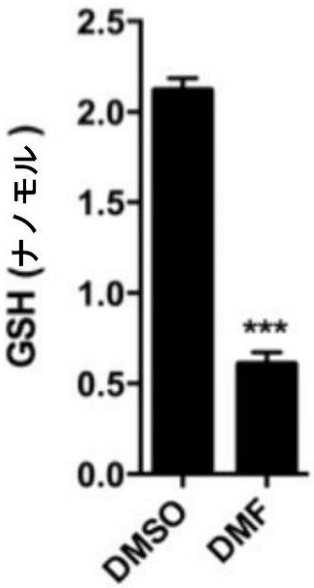
【図２５】



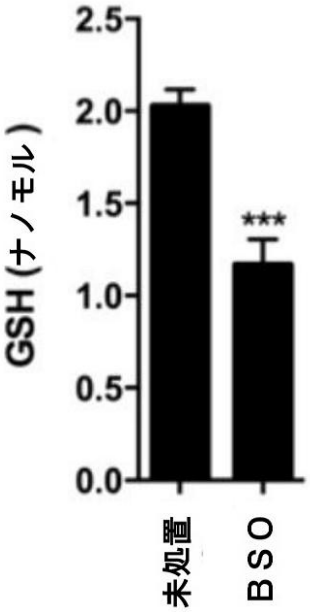
【図２６Ａ】



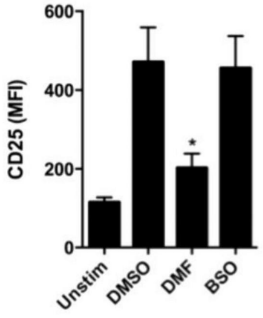
【図２６Ｂ】



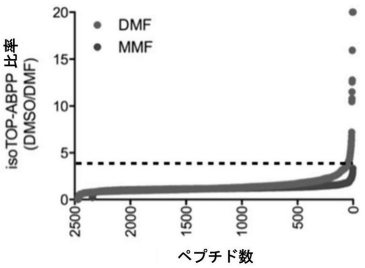
【図２６Ｃ】



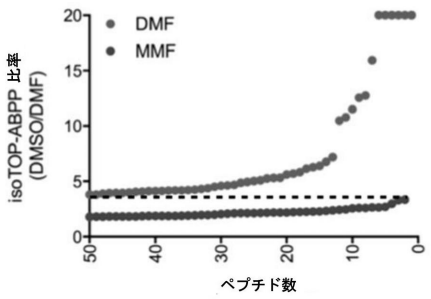
【図２６Ｄ】



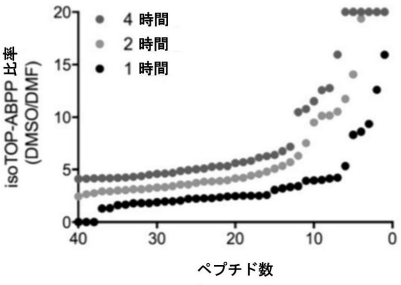
【図２７Ａ】



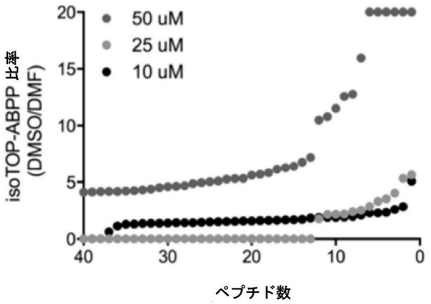
【図２７Ｂ】



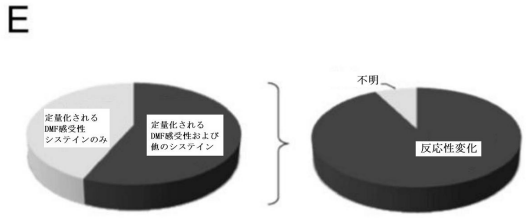
【図２７Ｄ】



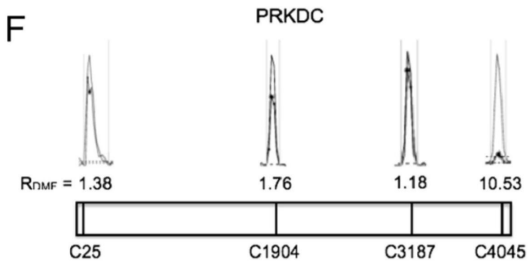
【図２７Ｃ】



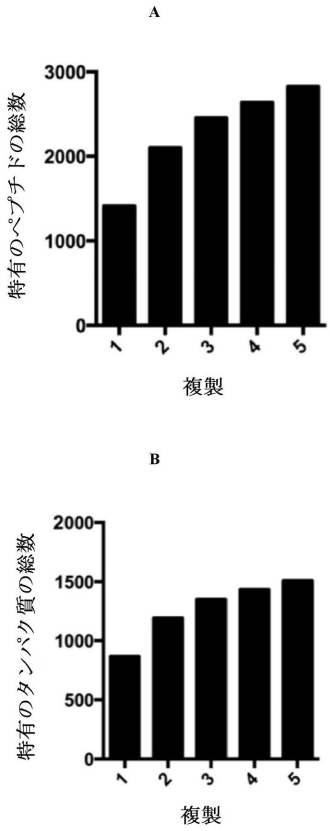
【図２７Ｅ】



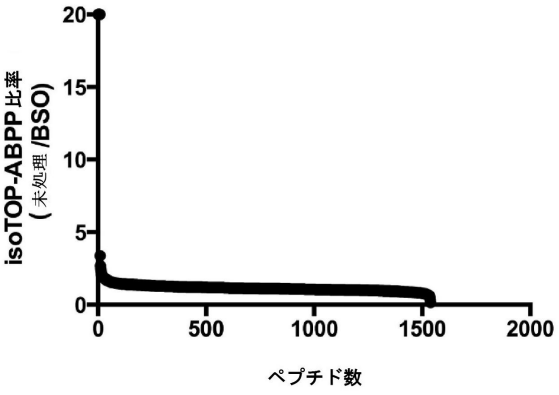
【図２７Ｆ】



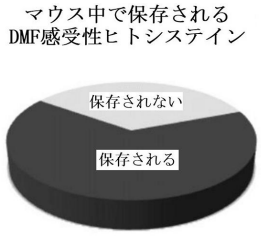
【図２８】



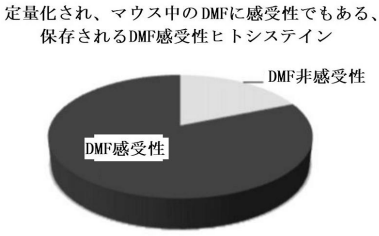
【図２９】



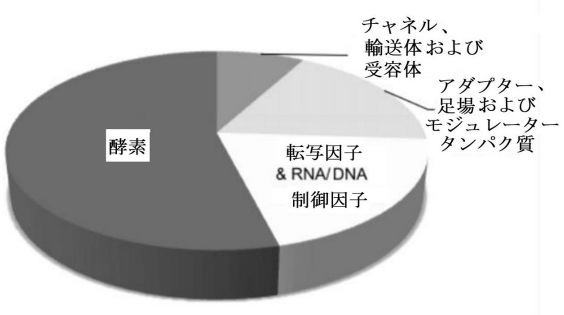
【図３０Ａ】



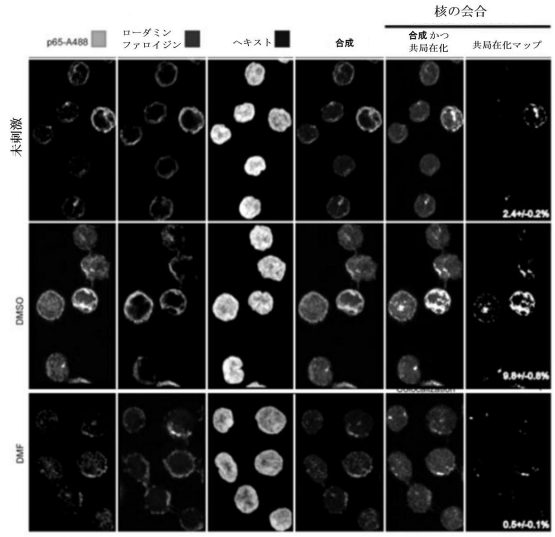
【図３０Ｂ】



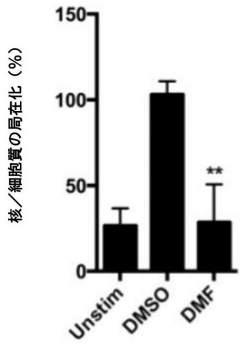
【図３０Ｃ】



【図３１Ａ】



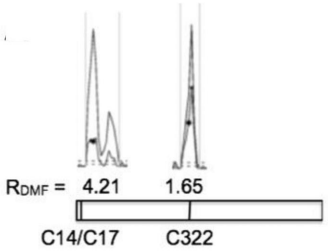
【図３１Ｂ】



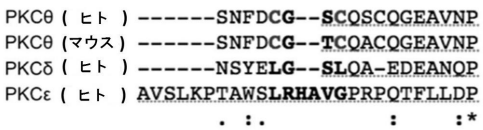
【図３１Ｃ】



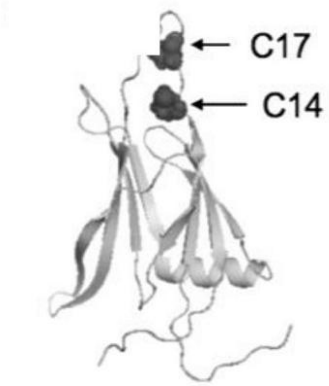
【図３２Ａ】



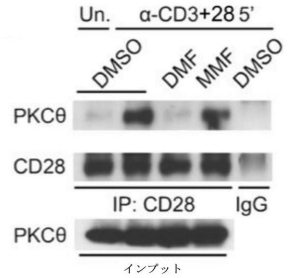
【図３２Ｂ】



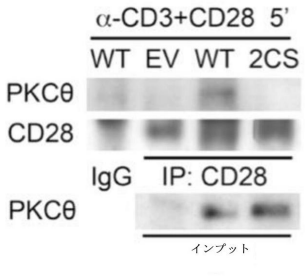
【図３２Ｃ】



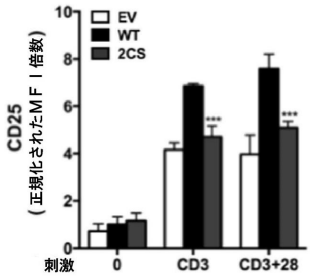
【図３２Ｄ】



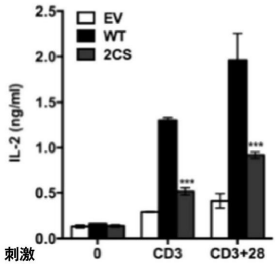
【図３２Ｅ】



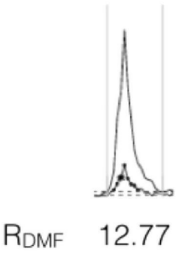
【図３２Ｆ】



【図３２Ｇ】



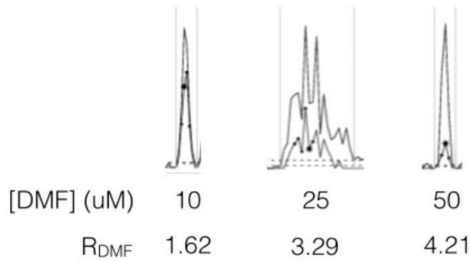
【図３３Ａ】



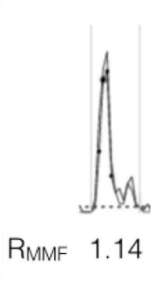
【図３３Ｂ】



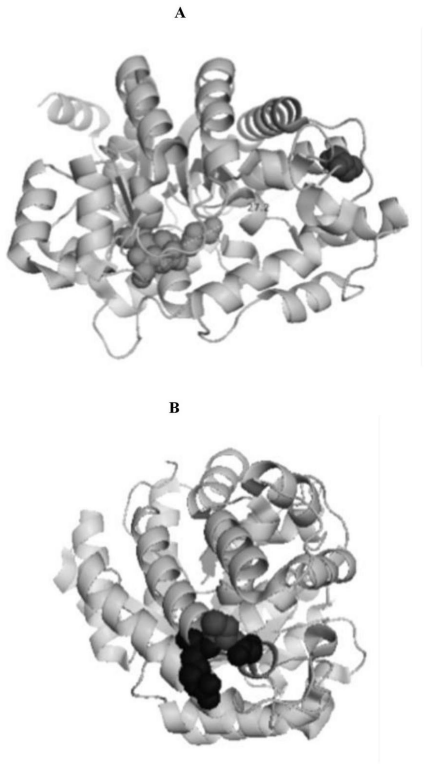
【図３３Ｃ】



【図３３Ｄ】



【図３４】



【配列表】

0006953400000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*9/10*	*(2006.01)*	C12N	9/10	
C12Q	*1/32*	*(2006.01)*	C12Q	1/32	
C12Q	*1/37*	*(2006.01)*	C12Q	1/37	
C12Q	*1/48*	*(2006.01)*	C12Q	1/48	Z

(72)発明者 バッカス, ケリアン エム.
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード １０５５０
(72)発明者 コレイア, ブルーノ イー.
スイス １１２１ ブランブラン ル・デ・プレソワール １３
(72)発明者 ブルーエット, メーガン エム.
アメリカ合衆国 ９２１３０ カリフォルニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント・パークウェイ １１３４０ アパートメント エス２０８
(72)発明者 テイジャロ, ジョン アール.
アメリカ合衆国 ９２１３０ カリフォルニア州 サンディエゴ カーメル・ビュー・ロード ４０６５ ユニット １７

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特表２０１１－５１７３１５（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５０２０３６（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１０／０００３７３５（ＵＳ，Ａ１）
Daniel Abegg, et al., Proteome-wide profiling of targets of cysteine reactive small molecules by using ethynyl benziodoxolone reagents, Angewandte Chemie International Edition, 米国, 2015年07月24日, vol. 54, pp. 10852-10856
Eranthie Weerapana, et al., Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes, Nature, 英国, 2010年, vol. 486, internal pages 1-8

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８