

光反応基ジアジリンを利用した分子生物学的手法の開拓

定金 豊,^{*,a} 畑中 保丸^b

Development of New Method for Molecular Biology Using the Photophore, Diazirine

Yutaka SADAKANE^{*,a} and Yasumaru HATANAKA^b

^aSchool of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka City 882-8508, Japan and ^bGraduate school of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan

(Received July 29, 2008)

Formation of a covalent bond using photoreactive groups allows one to maintain the complex between the ligand and its binding protein even under denaturing conditions. Thus, the photoreactive groups functioned as the powerful hook in the fishing of specific binding proteins. This is a very useful feature for developing the efficient and sensitive methods in molecular biology. Among the photoreactive groups, carbene-generating phenyldiazirine is a first choice for the application to the methods because the use of phenyldiazirine seems to be promising for achieving efficient crosslinking. This review describes improvements of phenyldiazirine usability and an application of phenyldiazirine to displayed phage screening. We synthesized the photoreactive diazirine units for a solution to preparing photoreactive ligands. Since the photoreactive units can be easily integrated into physiological ligands such as peptides, proteins, DNAs, and sugars by chemoselective reaction, the biochemists, who are not familiar with organic synthesis, can prepare the photoaffinity ligands using their interested ligands. We applied the phenyldiazirine to screening of displayed phages, and investigated the screening efficiency. The phages displayed specific-binding protein were extremely concentrated by using photoreactive peptide bearing diazirine. High efficiency in the screening is due to carry out intensive washing which removes almost all the unspecific binding phages. Moreover, such application overcomes the unavoidable drawback of photoreactive groups, the low efficiency of crosslinking because the isolated genes can be amplified.

Key words—diazirine; chemical proteomics; chemoselective reaction; Friedel-Crafts reaction; displayed phage

1. 分子生物学的手法へ光反応基を導入する

分子生物学的手法を用いて研究を始めた頃、誰もが使えるようなキットとして様々な方法論が提供されていることに驚いたことを覚えている。遺伝子の切り貼り、形質転換、クローニング法など、多種多様な分子生物学的手法を商業的に手に入れることができる。例えば、タンパク質同士の相互作用を簡便に、しかも確実に検出できる酵母 Two-hybrid 法は 1989 年に発表されたが、その数年後には商業的にキットとして販売された。^{1,2)} 酵母 Two-hybrid 法は技巧のすばらしさのみならず、新規の生物時計遺伝子を単離するという成功例により本方法論が実用的

であることを証明した。³⁾ さらには、ゲノム解読の成果を受け、6000 個あまりの酵母のすべてのオープンリーディングフレームを対象にしたタンパク質同士の結合について網羅的に調べ、全タンパク質の相互作用マップを酵母 Two-hybrid 法で作成したことも記憶に新しい。⁴⁾ このような偉大な成果をもたらす方法論までもが、誰もが使える形で提供されていることが分子生物学の魅力の一つといえよう。分子生物学的手法の最大の特徴は、遺伝子を中心に扱っていることであろう。遺伝子は 1 分子あれば同じものを増幅できる。すなわち莫大な分子の中からたった 1 分子を単離することができればクローニングが成功したことになり、好きなだけ増やして実験に用いることができる。タンパク質を主体に扱う生化学的手法ではどれだけの量が回収できたかが重要な問題であるが、遺伝子を扱う場合には大きな問題にならない。

^a九州保健福祉大学薬学部 (〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1), ^b富山大学大学院薬学研究院 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

*e-mail: sadapon@phoenix.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会 128 年会シンポジウム S16 で発表した内容を中心に記述したものである。

しかしながら、分子生物学研究の世界に身を寄せてみると、多くの成果は研究者の努力と執念が実らせたものであることに気付く。方法論に完璧なものはない。すべての方法には制限や限界があり、成功に導くためには命を削って研究を続けるしかない現状に気付くのである。現場では、さらに高効率で高感度な分子生物学的手法が求められている。われわれは、さらに優れた分子生物学的手法の開発を目指して、その手法に光反応基を導入することを試みた。光反応基の優れた特徴については後述するが、光を照射するだけで互いを共有結合で結び付けることができる性質は生体高分子の解析に最適であると思えたからだ。本総説では、光反応基の優れた特徴と、光反応基を誰にでも使えるようにした工夫を中心に紹介する。有機化学と分子生物学というヘテロな分野の融合を円滑に進めるために、この工夫は欠かせない。

2. 光反応基を導入する利点は何か

光反応基は、光エネルギーで容易に分解する化学官能基である。紫外領域の光を照射すると非常に反応性の高い中間体を生じる。中間体は最寄りの分子と電子のやりとりをし、安定な状態に落ち着く。その結果、光反応基は最寄りの分子と共有結合を形成する。なんらかの分子（例えばリガンド）に、あらかじめ光反応基を仕込んでおけば、その分子が結合する相手（例えば受容体）と共有結合を形成させることができる。光照射は生体高分子にほとんど影響を及ぼさないため、生体高分子の活性を保ちながらクロスリンクを形成することができる。このように光を照射するだけで互いを共有結合で結び付けられる性質は、生体高分子の解析に最適であるといえ、光反応基はリガンドと受容体とのマッチング及び相互作用機構の解明に有利な化学的性質を有しているといえる。⁵⁻⁷⁾

光反応基の利点は「釣り」に例えて説明すると分かり易い。リガンドに結合する受容体をクローニングする実験を、リガンドを餌、受容体を魚として考えてみる。リガンドと受容体との間には親和性があり、互いに結合しあう性質がある。ちょうど餌に寄り付く魚のようなものである。しかしながら、この釣りには「針」がない。餌を直接、糸に巻き付けて寄ってくる魚を釣ろうとしているのである [Fig. 1 (a)]. 針のない釣りでは釣果は期待できない。光反

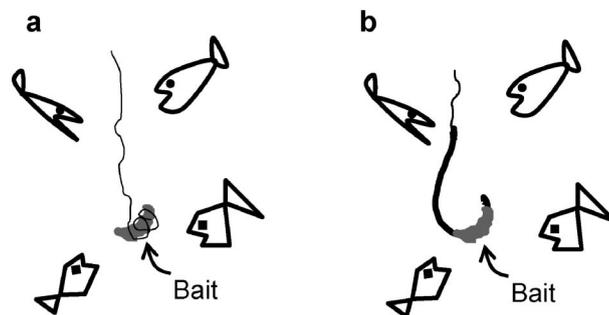


Fig. 1. Fishing the Target Protein with Photoreactive Bait
Photoreactive groups function as a fishhook, onto which ligands are placed as fish bait.

応基はこの釣りにおいて「針」の役目をする。リガンドに光反応基を装着することは、餌を針につけたことと同じ意味を持つ [Fig. 1 (b)]. 餌に呼び寄せられた魚を針で釣り上げるように、リガンドとの親和性で近付いた受容体に光を照射すれば、受容体を確実に釣り上げることができる。光反応基は光を照射したときだけ針として働くので、目的の魚が十分に近付いたときに光照射を行えば目的の獲物だけを釣り上げることができる。

光反応基という針のおかげで、どのような状態におかれてもリガンドと受容体の複合体は離れない。通常、リガンドと受容体との結合は変性状態になると解離する [Fig. 2 (a)]. これはリガンドとの結合には受容体分子の適切な高次構造が保たれていることが必須であるからである。光反応基を装着した光反応性リガンドを使用すれば、光照射によりリガンドと受容体とが共有結合で結ばれる。そのため変性状態でもリガンドと受容体が離れることはない [Fig. 2 (b)]. さらに、光反応基は特異的な結合であるか非特異的な結合であるかを見分ける力を持っている。光反応基から生じる中間体は非常に高反応性であるため、その近傍に存在する分子と共有結合を形成する。リガンドと受容体との結合が特異的で



定金 豊

島根県出身、静岡大学理学部卒業、山口大学理学研究科修士課程修了、岡山大学自然科学研究科博士課程修了、産業総合研究所 NEDO 特別研究員、富山大学薬学部助手を経て、九州保健福祉大学薬学部講師、2008年4月より同准教授 および京都大学原子炉実験所客員准教授 博士 (理学)、専門は分析化学、分子生物学

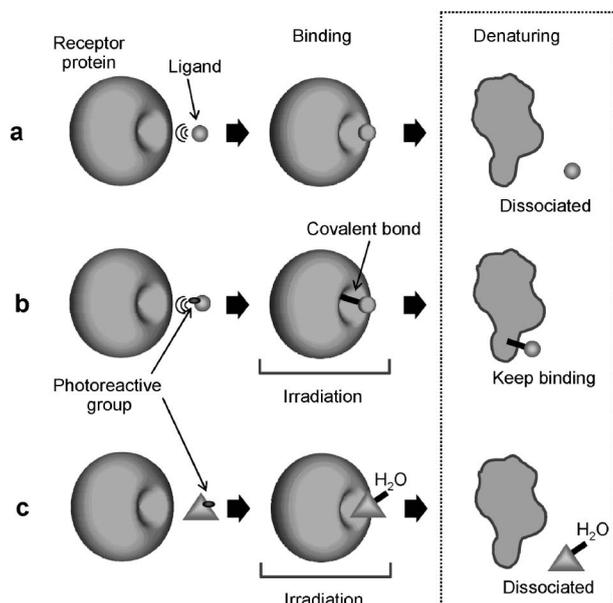


Fig. 2. Ligand-Receptor Complexes in Denaturing Condition

(a): The complex easily comes apart in an intact binding because the binding is dependent on the protein's higher ordered structure. (b): Formation of a covalent bond using photoreactive groups allows one to maintain the complex between the ligand and its binding protein even under denaturing conditions. (c): In unspecific binding, the photoreactive groups often form the crosslinking to unrelated compounds such as H_2O .

あれば、リガンドの最寄り分子は受容体であるが [Fig. 2(b)], 本来結合すべきでない受容体に非特異的にリガンドが結合すると、最寄り分子は他の分子 (例えば水分子など) であることが多くなる [Fig. 2(c)]. その結果、リガンドと受容体の間で共有結合を形成できず、変性状態にすると複合体は解離してしまう。このように光反応性リガンドを利用すると特異的な結合だけを選ぶことができる。光反応基は「離さない」という利点と「選ぶ」という利点を合わせ持つ分子である。このような分子を分子生物学的な手法に導入すれば、結合分析の高感度化、スクリーニングの効率化に役立つであろう。また、変性状態でも複合体が保たれているという性質は、リガンドと受容体のような組み合わせの結合解析をする手段の幅を大きく広げ、これまで適用できなかった分析技術を使用することも可能にするだろう。

3. 光反応基の欠点は分子生物学的手法への導入で克服できる

分子生物学的手法への光反応基の導入は、分子生物学的手法を改良するばかりか、光反応基にとってもその欠点を克服するという相乗効果が期待でき

る。光反応基の欠点は、目的タンパク質へのクロスリンク効率が低いことである。これは、光反応基が生成する中間体の反応性が非常に高いため、近くにあれば水分子にすらクロスリンクするためであり、光反応基の化学的性質上、回避できない問題である。光反応性 DNA を用いた実験で、20–50%の高効率なクロスリンクが報告されていることもあるが、⁸⁾ 高効率が強調すべき事項であることは、その他多くの光反応基のクロスリンク効率が低いことを示している。われわれも光反応性カルモジュリン (CaM) 結合ペプチドと CaM タンパク質とのクロスリンク効率を調べてみた (Fig. 3)。光反応性 CaM 結合ペプチドにビオチンタグを装着し、このタグを頼りにペプチドとタンパク質のクロスリンク複合体を SDS-PAGE で調べた [Fig. 3(a)]。照射時間が長くなるに従い複合体のバンドが濃くなり、おおよそ 60 秒で最大となった。クロスリンク効率は、逆相 HPLC で CaM タンパク質単独とペプチド-タンパク質の複合体とを分離し、それぞれを定量して決定した [Fig. 3(b)]。クロスリンク効率は電気泳動で調べた結果と同様に 60 秒で最大になり、3%程度と見積もられた。クロスリンク効率が低いという光反応基の欠点は、しばしばクロスリンクした標的タンパク質の同定を困難なものにする。しかし、分子生物学的手法には遺伝子を扱うものが多く、遺伝子は 1 分子あれば同じものを増幅できる。光反応基でクロスリンクする対象が遺伝子、又はその発現タンパク質であれば、クロスリンクする効率が低くても問題にならない。遺伝子は単離さえできれば、いくらでも増やして実験に用いることができるからだ。このように分子生物学的手法への光反応基の導入は、両者に利益をもたらす理想的な組み合わせであるといえる。

4. どの光反応基を使えばよいか

光反応基にはいくつかの種類があり、それぞれ化学的に異なった性質を持つ。どの光反応基を利用するかは、効率的な分子生物学的手法を作り上げるうえで重要な選択である。現在、生命現象の解明に広く使われている光反応基は、アジド、ジアジリン、カルボニルの 3 種類である (Fig. 4)。アジドは 300 nm 付近の光を吸収し、反応性の高い中間体ニトレンを生じる。アジドの利点は合成が容易なこと、他の光反応基に比べて小さな構造のために修飾によ

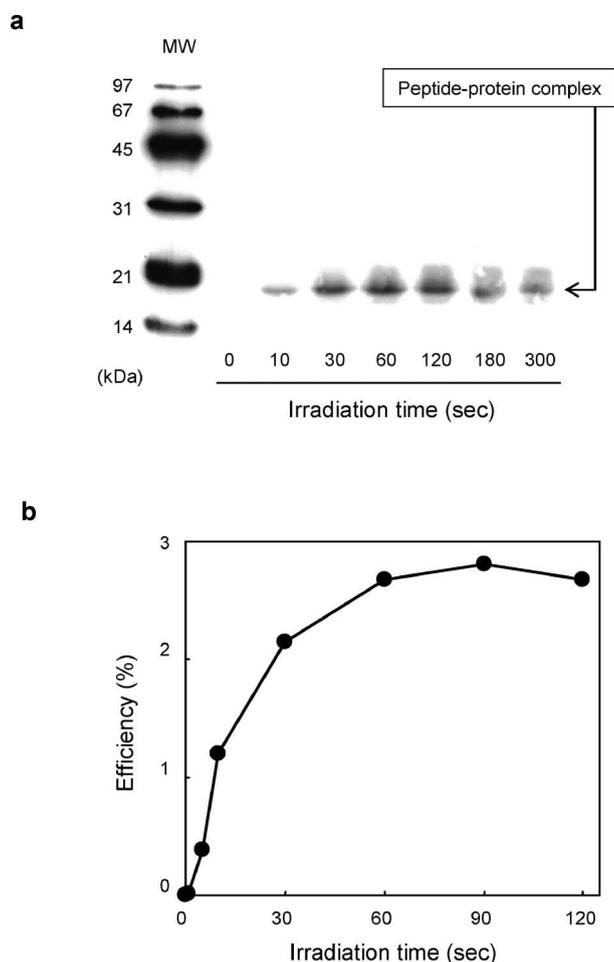


Fig. 3. Crosslinking Efficiency of Photoreactive Group

(a): Effect of irradiation time for the photoaffinity labeling of calmodulin protein with the photoreactive calmodulin-binding peptide. The mixtures of calmodulin and the peptide were separated by SDS-PAGE and visualized by chemiluminescence of biotin-avidin system. (b): Time course of photoaffinity labeling of calmodulin protein by photoreactive peptide. Photolysis of the complex performed by UV-A irradiation with 30 W/m^2 of 360 nm light at 0°C after incubation at 37°C for 10 min in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing CaCl_2 (5 mM), and NaCl (0.15 M). After irradiation, photoproducts were chromatographed on reverse-phase HPLC (ODS) with 0.1 % aqueous trifluoroacetic acid using a gradient of CH_3CN from 40 to 60 %.

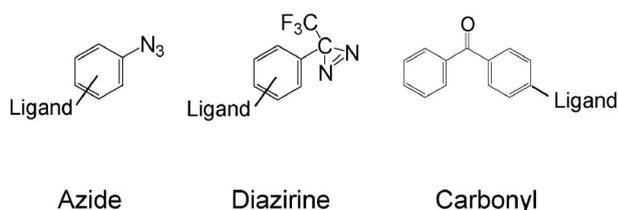


Fig. 4. Three Major Photoreactive Groups

るリガンドの構造変化を小さくできる点である。商業的に利用できる誘導体の数も群を抜いており、光反応基としての使用例も数多い。ジアジリンは 360 nm 付近の光を吸収し反応性の高い中間体カルベン

を生じる。様々な有機合成条件下でも安定であり、例えば、ニトロ化や Friedel-Crafts 反応の条件に耐えることができ、固相ペプチド合成反応においても無保護で取り扱うことが可能である。⁹⁾ 反応中間体カルベンはニトレンよりも高い反応性を示し、炭素原子上に共有結合を形成するのでクロスリンクの安定性においても優れている。¹⁰⁾ ニトレンでのクロスリンクはアミノ酸配列を決めるための分解反応により切断されてしまうことが報告されており、機能部位解析に重要なクロスリンク部位の決定が困難であると指摘されている。¹¹⁾ 光反応基ベンゾフェノンに代表されるカルボニル基 ($\text{C}=\text{O}$) は、360 nm 付近の光でラジカル性の強い励起三重項状態になり、主に相手分子の炭素上の水素原子を引き抜いた結果、生じた炭素ラジカル対と共有結合を形成する。水分子とは反応せず、反応する相手がないときには光分解せずに繰り返し光反応できる性質を持つため、一般的に高いクロスリンク効率が期待できる。その反面、反応する相手をえり好みすることが指摘されており、¹²⁾ 光反応基の特色の一つである「獲物を選ぶ」という利点が発揮できない。

どの光反応基にも利点と欠点があり、どれを利用すればよいかはそれらの化学的性質からは判断できない。実際にクロスリンク実験を行った結果に答えを求めることにする。光反応基を DNA に導入し、その DNA に結合するタンパク質を調べる実験を行った (Fig. 5)。図中の矢印で示したバンドをみると、ジアジリンは 5 分間の光照射で十分なクロスリンク効率が得られたが、ベンゾフェノンでは 20 分間の光照射でもクロスリンクの効率は低い。光分解しないためにクロスリンク効率が低いと言われているベンゾフェノンであるが、ジアジリンの方が短時間でクロスリンクを形成した。短時間でクロスリンクを形成する能力は生体高分子を扱う上で都合がよい。そのほかにも、グルコーストランスポーターを標的タンパク質として、アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンの光反応性糖鎖で解析した実験、標的分子に様々な光反応基を装着した光反応性ペプチドを用いた実験などから、光反応基ジアジリンが好成績をおさめている。¹³⁻¹⁶⁾ このように、光反応基ジアジリンは生命現象の解明に優れた特性を持っていると言える。効率的な分子生物学的手法を作り上げるためには、光反応基としてジアジリンを利用するのが

最善であると結論した。

5. 光反応基を利用するための準備

光反応基を導入して効率のよい分子生物学的手法を開発するためには、まず、光反応基を装着した光反応性リガンドを簡便に作る方法論が必要である。分子生物学的手法を開発したとしても、光反応性リガンドを簡便に作れる技術が伴っていなければ絵に描いた餅になってしまう。われわれは生体内で重要なリガンドとして働いているペプチド、タンパク質、DNA、糖鎖などを簡便に光反応性リガンドにできる技術を開発した (Fig. 6)。生体高分子の多くは

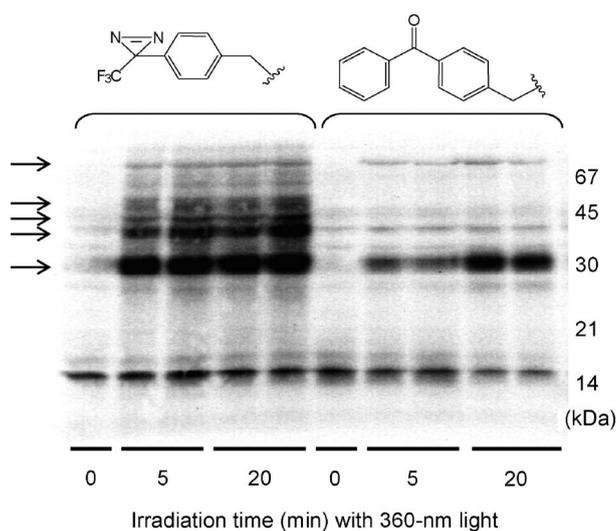


Fig. 5. Comparison of Crosslinking Efficiencies
Photoaffinity labeling to HeLa cell nuclear extract using the photoreactive DNA bearing diazirine or benzophenone is shown. Arrows on left side of the gel indicate the crosslinked complexes.

特異的に反応する官能基を持っている。その官能基を狙って光反応基を装着できれば、生体高分子の特異的な部位に光反応基を導入することが可能である。例えば、ペプチドやタンパク質中のある部位にシステイン残基を導入すれば、そのチオール基に特異的に光反応基が導入できる。また、糖鎖の還元末端のアルデヒド基も光反応基を導入するのに便利な官能基である。DNAのような単位構造物が多数結合した構造分子でも、合成時にリン酸基の1つをチオリン酸基に置き換えれば、部位特異的に光反応基を導入することができる。生体高分子の特異的な官能基に導入可能な光反応基ジアジリン化合物を作製し、光反応ユニットと名付けた。チオール基と特異的に反応するユニット [Fig. 6 (化合物6)] は、中性付近でシステイン残基を持ったペプチドやタンパク質に混ぜるだけで、チオール基特異的に導入することができ、反応の特異性、収率ともに非常に高く、簡単に光反応性ペプチドやタンパク質を作製することができる。¹⁷⁾ 臭化物であるユニット (化合物4) は、DNAのリン酸基の一部をチオリン酸基で置き換えて合成したS化DNAと混合するだけで簡単に光反応性DNAを作製することができる。¹⁶⁾ アミノオキシ基を持つユニット (化合物7) はアルデヒド基と特異的に反応し、糖鎖の還元末端に特異的に導入できる。¹⁸⁾ 官能基特異的な導入方法とは異なるが、ペプチド固相自動合成機を使用して光反応性ペプチドを作製することを考え、ジアジリンを持った光反応性アミノ酸ユニット (化合物5) を作製し

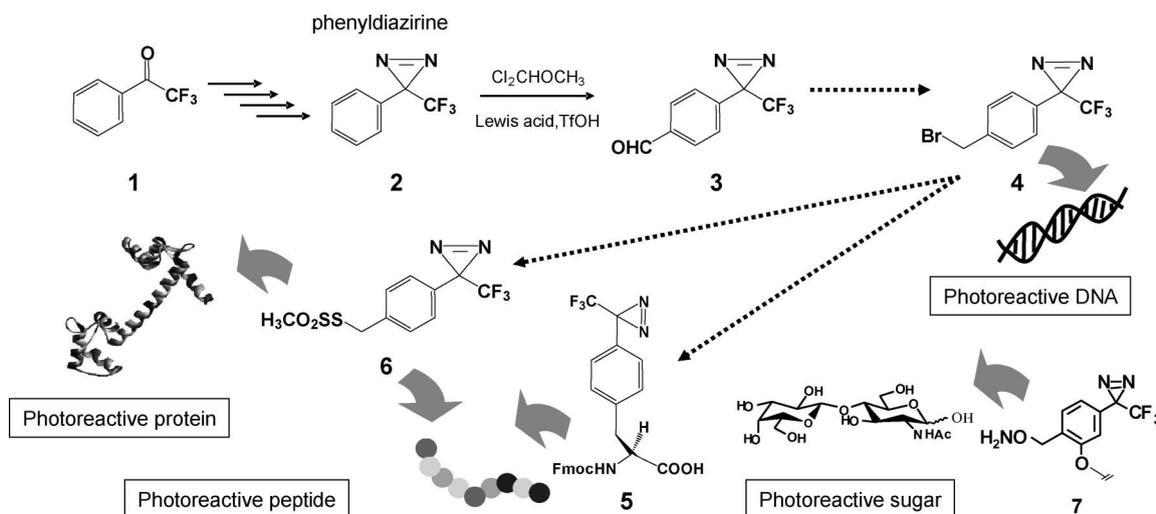


Fig. 6. Photoreactive Units and Their Syntheses

た。側鎖であるジアジリンを保護することなく合成が可能で通常の Fmoc アミノ酸と同様に使用することができる。¹⁹⁾ このような光反応ユニットが開発されたことにより、単に混ぜるだけでタンパク質、ペプチド、DNA、糖鎖を光反応性リガンドにすることができるようになった。混ぜるだけであるので、実験を始めたばかりの研究者でも簡単に光反応性リガンドを作製することができる。混ぜたあとにカラムで精製するステップを考慮しても、数日で光反応性リガンドを得ることができ、誰もが簡単・迅速に作製できる環境が整った。

われわれはさらに、光反応ユニットの合成方法についても改良を加えた (Fig. 6)。2,2,2-trifluoro-1-phenyl-ethanone (化合物 1) から phenyldiazirine (化合物 2) を数百グラム単位で容易に大量合成する方法は確立されている。²⁰⁾ この phenyldiazirine のベンゼン環上に足掛かりとなる置換基を選択的に導入することができれば、光反応ユニットを大量に作製することができる。ベンゼン環への置換基導入の手掛かりとしてホルミル基を選び、ルイス酸として五フッ化アンチモン (SbF₅) 又は四塩化チタン (TiCl₄) を使用し、トリフルオロメタン sulfonic acid (TfOH) の存在下、phenyldiazirine の Cl₂CHOCH₃ による Friedel-Crafts 反応により、パラ位がアルデヒド置換されたフェニルジアジリンアルデヒド (化合物 3) を合成することに成功した。¹⁹⁾ この合成法の開発により、数百グラム単位のフェニルジアジリンアルデヒドを手に入れることが可能となり、アルデヒドから容易にかつ高収率でエステル (-CO₂CH₃)、アルコール (-CH₂OH)、臭化物 (-CH₂Br, (化合物 4))、メタンチオ硫酸化合物 [-CH₂SSO₃CH₃, (化合物 5)] に変換できる。さらに、ジアジリン型の光反応性アミノ酸の合成法についても検討した。これまで光反応性アミノ酸の光学活性体は、ラセミ体の酵素による限定分解で得る方法と、キラルなニッケル複合体存在下で不斉合成する方法で行われていた。^{21,22)} 前者の方法では酵素処理が制限となり、後者の方法では高価なキラルな複合体を等量用いる必要があることから大量合成はできない。われわれはシンコニジン誘導体を用いた触媒的不斉アルキル化により、光反応性アミノ酸の光学活性体を高収率で大量合成できる方法を確立した。¹⁹⁾ このようにジアジリンの光反応ユニットを大量に合成する方法を確立した。試

薬メーカーから光反応ユニットを入手できるようになれば、本当の意味で誰もが使える光反応ユニット化技術を確立できたことになる。商業化の難関の 1 つが突破できた意味で、上記の光反応ユニットの大量合成法の開発は重要な成果であるといえる。

6. 分子生物学的手法への光反応基の導入例

ジアジリン型光反応性アミノ酸 [Fig. 6 (化合物 5)] を利用して、光反応性 CaM 結合ペプチドを作製し、分子生物学的手法の 1 つである提示ファージのスクリーニング法に導入した例を紹介する (Fig. 7)。CaM 結合ペプチドとして 17 残基のアミノ酸から構成される人工配列を使用し、タンパク質との結合に重要であることが報告されている N 末端から 3 残基目のトリプトファン残基²³⁾ を光反応性アミノ酸に置き換えて合成した [Fig. 7(a)]。Fmoc アミノ酸を用いる通常の方法でペプチド固相自動合成機を使って合成し、N 末端にビオチンを導入した。CaM タンパク質を提示したファージに対して 100000 倍量の野生株ファージを含む混合溶液を調製し、1 回のスクリーニングで CaM 提示ファージが何倍に濃縮されるかを調べた [Fig. 7(b)]。フ

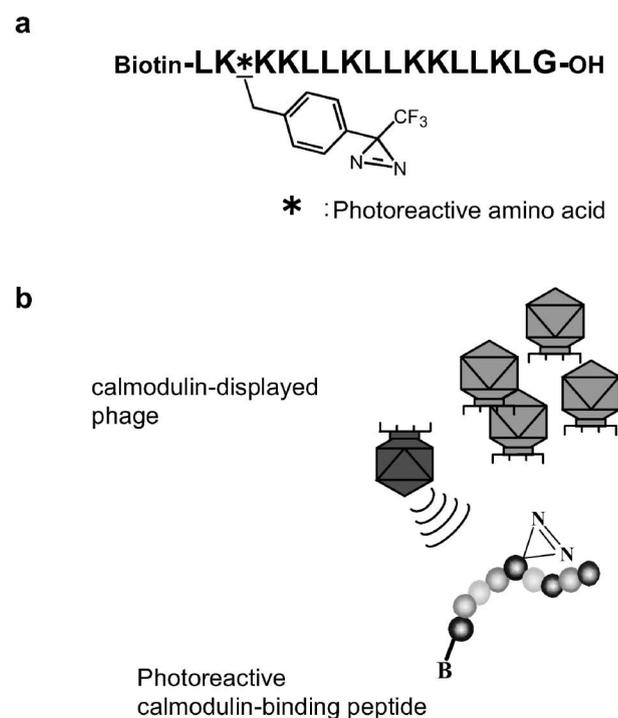


Fig. 7. Photochemical Screening of Displayed Phage

(a): Photoreactive calmodulin-binding peptide prepared with Fmoc-photoreactive amino acid. (b): Scheme of photochemical screening of displayed phage with the photoreactive peptide.

フェージの混合液中に光反応性 CaM 結合ペプチドを加え、しばらく静置したのち、光照射を行った。徹底的に洗浄したのちに残ったフェージをプレートに撒き、プラークハイブリダイゼーションによって CaM 提示フェージの数を計測した。その結果、従来のスクリーニング法の濃縮率が 100 倍以下であったのに対し、1 回の光化学的スクリーニングでは約 13000 倍に CaM 提示フェージが濃縮できることが明らかになった。分子生物学的手法の 1 つである提示フェージのスクリーニング法に光反応性リガンドを導入することで、非常に効率の高いスクリーニングを実施することができた。

7. まとめ

生体内の結合は可逆的なものであり、それらは水素結合や疎水結合などの弱い結合の総和としてなり立っている。そのために結合力（親和性）の強さは様々であり、スクリーニングとは様々な親和性のものの中から親和性の高いクローンを選択することである [Fig. 8(a) 左図]。親和性の低いクローンは洗浄で取り除かなければならないが、親和性が幅広く分布しているためにどれ位の強度で洗浄してよいか定まらず、非特異的な結合のクローンが残り易い [Fig. 8(b) 左図]。さらに、親和性の高いクローンの数は低いクローン数に比べて極めて少ないので、目的のクローンを取り出すことは難しい。このスク

リーニングに光反応基を導入すると、光反応基が持つ利点である「離さない」と「選ぶ」という性質により、特異的に結合している親和性の高いクローンに共有結合を形成できる。その結果、(クロスリンクされた) 高い親和性を持つクローンとそれ以外の二つの状態に分けることができ [Fig. 8(a) 右図]、界面活性剤を含むような強力な洗浄液で徹底的に洗浄することが可能になる [Fig. 8(b) 右図]。このような理由でフォトパニング法は非常に効率的なものになったと考えている。

光反応基ジアジリンは生命現象の解明に優れた性質を持つ。生体高分子と混ぜるだけで光反応性リガンドに変換できるような光反応ユニットを開発し、簡便にタンパク質、ペプチド、DNA、糖鎖を光反応性リガンドにできるようになった。分子生物学的手法に光反応基ジアジリンを導入する試みは始まったばかりであるが、提示フェージのスクリーニングにおいて効率が上昇することを確認できた。今後も様々な分子生物学的手法に光反応基ジアジリンを導入し、新しい方法論の開発を進めていきたい。

謝辞 本論文の作成に当たりご協力頂いた木葉敬子助手に感謝します。研究の一部は、科学研究費補助金（奨励研究、萌芽研究、基盤研究 B 及び C）、文部科学省特定研究及び武田科学振興財団の助成の下に行われました。

REFERENCES

- 1) Fields S., Song O.-K., *Nature*, **340**, 245–246 (1989).
- 2) Chien C.-T., Bartel P. L., Sternglanz R., Fields S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 9578–9582 (1991).
- 3) Gekakis N., Saez L., Delahaye-Brown A.-M., Myers M. P., Sehgal A., Young M. W., Weitz C. J., *Science*, **270**, 811–815 (1995).
- 4) Uetz P., Glot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emlli A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S., Rothberg J. M., *Nature*, **403**, 623–627 (2000).
- 5) Dormán G., Prestwich G. D., *Trends Biotech.*, **18**, 64–77 (2000).

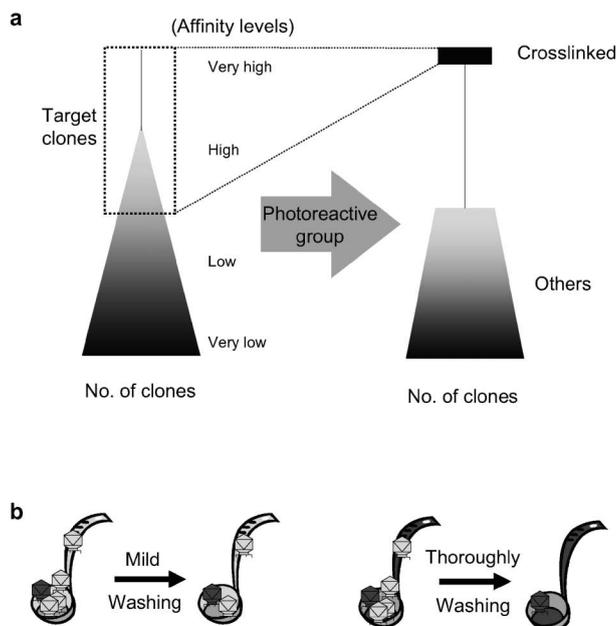


Fig. 8. Roles of Photoreactive Group in Screening Experiments

- 6) Dormán G., *Top. Curr. Chem.*, **211**, 169–225 (2000).
- 7) Hatanaka Y., Sadakane Y., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 271–288 (2002).
- 8) Shigdel U. K., Zhang J., He C., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 90–93 (2008).
- 9) Hatanaka Y., Nakayama H., Kanaoka Y., *Rev. Heteroatom Chem.*, **14**, 213–243 (1996).
- 10) Hatanaka Y., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 619–636 (1994).
- 11) Maliarik M. J., Goldstein I. J., *J. Biol. Chem.*, **263**, 11274–11279 (1988).
- 12) Wittelsberger A., Thomas B. E., Mierke D. F., Rosenblatt M., *FEBS Lett.*, **580**, 1872–1876 (2006).
- 13) Yang J., Clark A. E., Kozka I. J., Cushman S. W., Holman G. D., *J. Biol. Chem.*, **267**, 10393–10399 (1992).
- 14) Weber P. J. A., *J. Pept. Res.*, **49**, 375–383 (1997).
- 15) Tate J. J., Persinger J., Bartholomew B., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1421–1426 (1998).
- 16) Sadakane Y., Takagi T., Tomohiro T., Tsurusawa K., Konoha K., Kawahara M., Hatanaka Y., *Photomed. Photobiol.*, **26**, 35–40 (2004).
- 17) Kaneda M., Sadakane Y., Hatanaka Y., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 849–852 (2003).
- 18) Hatanaka Y., Kempin U., Park J.-J., *J. Org. Chem.*, **65**, 5639–5643 (2000).
- 19) Nakashima H., Hashimoto M., Sadakane Y., Tomohiro T., Hatanaka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15092–15093 (2006).
- 20) Brunner J., Senn H., Richards F. M., *J. Biol. Chem.*, **255**, 3313–3318 (1980).
- 21) Nassal M., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7540–7545 (1984).
- 22) Fishwick C. W. G., Sanderson J. M., Findlay J. B. C., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4611–4614 (1994).
- 23) O’Neil K. T., Wolfe Jr. H. R., Erickson-Viitanen S., DeGrado W. F., *Science*, **236**, 1454–1456 (1987).