

合成小分子化合物群を用いた  
ペプチド性天然化合物合成酵素に対する  
網羅的機能解析技術の開発に関する研究

2015

笠井 昭太





## 目次

序論	6
本論	10
第一章	10
競合的 activity-based protein profiling (ABPP) による 内在性 NRPS アデニレーション (A) ドメインの網羅的機能解析	
第二章	33
NRPS 担体タンパク質 (CP) の翻訳後修飾を標的とした分子ツールの開発	
結論	55
実験項	57
第一章	57
第二章	112
引用文献	131
謝辞	135

## 略語

A	adenylation
ABPP	activity-based protein profiling
AcpH	acyl carrier protein hydrolase
Ala	alanine
AMP	adenosine 5'-monophosphate
AMS	adenosine 5'-monosulfamate
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
ATP	adenosine 5'-triphosphate
AusA	aureusimine synthetase A
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BSA	bovine serum albumin
C	condensation
calcd	calculated
CBB	coomassie brilliant blue
CoA	coenzyme A
CP	carrier protein
Da	dalton
DCHA	dicyclohexylamine
DEAD	diethyl azocarboxylate
DIBAL	diisobutylaluminium hydride
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
E	epimerase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
EtOAc	ethyl acetate
FL	fluorescence

Gln	glutamine
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
GrsA	gramicidin S synthetase 1
GrsB	gramicidin S synthetase 2
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HF	hydrogen fluoride
His	histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	high resolution
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
Ile	isoleucine
IT	ion trap
<i>K</i> <sub>m</sub>	Michaelis constant
LC	liquid chromatography
LDA	lithium diisopropyl amide
Leu	leucine
LiHMDS	lithium bis(trimethylsilyl)amide
Lys	lysine
MesG	2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside
Met	methionine
MS	mass spectrometry
Ms	mesyl
NaOH	sodium hydroxide
NMR	nuclear magnetic resonance
NRP	nonribosomal peptide
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
Orn	ornithine
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Pant	panthetheine
Ph	phenyl
pH	potential hydrogen, power of hydrogen

Phe	phenylalanine
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PPant	phosphopantetheine
PP <sub>i</sub>	diphosphoric acid
PPTase	4'-phosphopantetheine transferase
Pro	proline
quant.	quantitative
Rh	rhodamine
rpm	rotation per minute
rt	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
SrfA-A	surfactin synthetase subunit 1
SrfA-B	surfactin synthetase subunit 2
SrfA-C	surfactin synthetase subunit 3
Su	succinimide
TAMRA	tetramethylrhodamine
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBTA	tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TCA	trichloroacetic acid
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TE	thioesterase
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TLC	thin-layer chromatography
TOF	Time-of-Flight
<i>t</i> <sub>R</sub>	retention time
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp	tryptophan
Trt	trityl

TycB	tyrocidine synthetase 2
Tyr	tyrosine
UV	ultraviolet
Val	valine
VIS	visible

## 序論

微生物は多種多様な化合物を二次代謝産物として産生している。その一種に、ペプチド性天然化合物である非リボソーム性ペプチド (nonribosomal peptide, NRP) と呼ばれる一群が存在する (Figure 1)<sup>1,2</sup>。NRP は多様な分子構造と生物活性を有しており、しばしばそれら化合物をターゲットとした合成研究や、その生物活性の作用機序解明研究が行われてきた。NRP は微生物の生存には必須でないものの、その生物活性の中には増殖因子や他の微生物に対する傷害作用などが知られている。そのため、現在では微生物が生存競争の上で有利に働くために生産されていると考えられている。そして、その生物活性は我々の生活に利益をもたらすものであることもある。例えば、抗生物質であるバンコマイシン<sup>3</sup>や免疫抑制剤シクロスポリン<sup>4</sup>など、現在では医薬品として用いられている NRP である。そのため、NRP は創薬シード化合物として注目され、盛んに微生物からの探索研究が行われてきた。その結果、有用な NRP が見つかった一方で、病原細菌からは病原性因子として機能する NRP であるピオベルジン<sup>5,6</sup>やマイコバクチン<sup>7</sup>なども見つかった。そのため、NRP の生産制御を目的に、その二次代謝経路を対象とした研究が行われている。

NRP は非リボソーム性ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) と呼ばれている酵素群によって合成される (Figure 2)<sup>8,9</sup>。NRPS は、他の一般的な酵素とは異なる特徴を有するため、魅力的な研究対象となっている。NRPS はいくつかの異なる酵素活性を有するドメインが複数連なった構造をしており、その分子量は 300 から 800 kDa と巨大なタンパク質である。NRPS は、アデニレーション (A) ドメイン、キャリアプロテイン (CP)、コンデンセーション (C) ドメインを基本単位とするモジュールが複数連なり構成される。これらドメインが体系的に特徴的な酵素触媒反応を繰り返すことで NRP は合成されている。その一つである A ドメインは、NRP 合成におけるゲートキーパーとしての役割を担っている (Figure 3)<sup>10</sup>。A ドメインは厳密な基質特異性を有し、生体内プールから選択した特定のアミノ酸と ATP から高反応性中間体であるアミノアシル-AMP を合成する。もう一つの必須ドメインである CP は NRPS の機能発現に必須である翻訳後修飾を受ける部位であり、NRP のビルディングブロックであるアミノ酸を担持する役割を有する。微生物の生体内で産生された新生 NRPS は酵素機能として不活性な状態にある。そのような *apo*-NRPS は、ホスホ

パンテテイントランスフェラーゼ (4'-phosphopantetheinyl transferase, PPTase) と補酵素 CoA により生体内で速やかに翻訳後修飾を受ける<sup>11</sup>。すべての CP の、高度に保存された配列の Ser 残基にホスホパンテテイン (phosphopantetheine, PPant) が付加され、活性な *holo*-NRPS となる。その付加された PPant 末端のチオール基が A ドメインで合成されたアミノアシル-AMP の活性化されたアシル基に対して求核攻撃することで、AMP の放出に伴いアミノ酸とチオエステル結合を形成する。こうして、A ドメインの基質特異性に応じて取り込まれたアミノ酸が NRP のビルディングブロックとして NRPS の CP 上に担持される。この担持されたアミノ酸が C ドメインによって、上流のアミノ酸から下流のアミノ酸へと順次縮合されることで、NRP が合成されている。

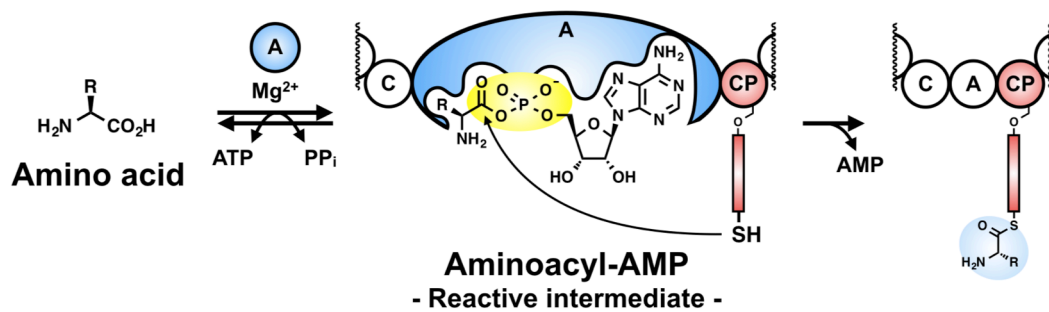
NRP は NRPS によって厳密に制御され合成されている。NRPS の酵素機能を詳細に解析することで、NRPS から合成される NRP を理解することができる。また、NRPS を遺伝子工学的手法によって制御可能となることで人為的に NRPS によるペプチド性化合物の合成が可能となり、医薬品の供給や新規医薬品候補化合物の合成が期待される。そのため、NRP の二次代謝経路の解明を目的に様々な NRPS の特徴的な機能解析の手法が開発されている。今日までに開発されてきた方法は精製されたタンパク質を用いる方法である。微生物はそのゲノムに複数の NRPS 生合成遺伝子クラスターを保有していると推測されており、莫大な数の NRPS が存在するといわれている<sup>12</sup>。また、NRPS は巨大タンパク質である。そのため、一般的に用いられている遺伝子工学的手法では課題となる点がある。巨大な NRPS ほど発現ベクター構築が難しく、異種宿主発現ではタンパク質が発現されないことや、酵素活性を失っていることもある。そのため、微生物が保有するあらゆる NRPS をすべて発現、精製し機能解析することは困難である。内在性 NRPS を直接解析に用いることで、簡便かつ生体内における NRPS の詳細な機能解析が可能となる。

そこで本研究では、微生物が産生した内在性 NRPS に適用可能な網羅的機能解析技術の開発を行った。第一章では A ドメインの活性部位指向型標識化プローブと阻害剤ライブラリーを用いた内在性 NRPS の網羅的基質特異性解析法の開発、第二章では内在性 NRPS の CP に対する翻訳後修飾を標的とした選択的検出プローブの開発を行った。その研究成果について以下に詳細を述べる。





- Adenylation (A) domain



- Carrier protein (CP) motif

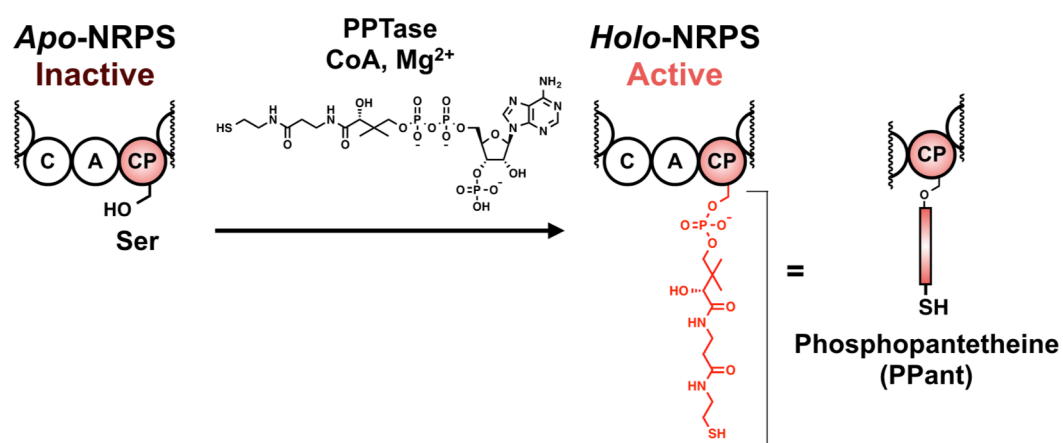


Figure 3. Enzymatic reaction of A- and CP- domains in NRPS modules.

## 本論

### 第一章

#### 競合的 activity-based protein profiling (ABPP) による 内在性 NRPS アデニレーション (A) ドメインの網羅的機能解析

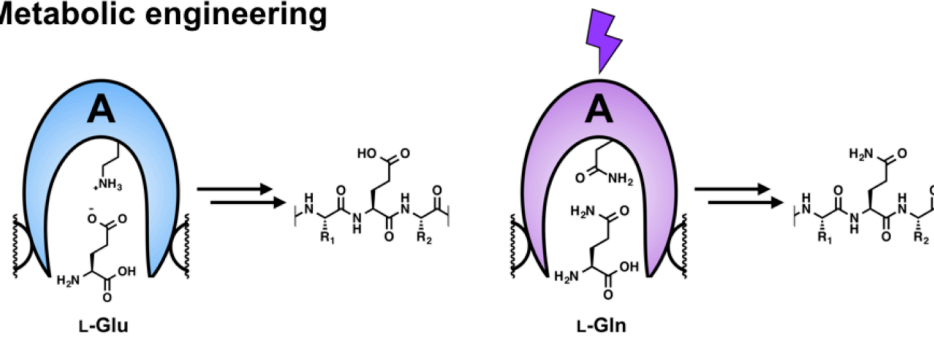
A ドメインは NRP 合成において、そのビルディングブロックとなる基質を選択し NRP の構造を決定づける重要な役割を果たしている。これまでに NRPS を利用し、人為的に任意のペプチド性化合物を合成する研究がいくつも報告されている。生合成機構上、これら研究の標的として A ドメインが注目されてきた。A ドメインの活性部位を構成する複数のアミノ酸が、同一アミノ酸に基質特異性を有する A ドメイン間で高度に保存されており、基質特異性の制御に重要であることが知られている。そのようなアミノ酸配列を A ドメインコードと呼ぶ<sup>13</sup>。代謝工学的手法によって、この A ドメインコードを構成するアミノ酸に変異をいれることで活性部位の静電相互作用様式を改変し、本来のビルディングブロックである Glu から Gln に置換した NRP が産生されたことが報告されている (Figure 1-1)<sup>14</sup>。コンビナトリアル生合成では、変異を導入したいアミノ酸を認識する A ドメインを、異なるアミノ酸を基質とする A ドメインと置換する (ドメインスワッピング)<sup>15</sup>、または基質認識に重要なドメインの一部のみを置換する (サブドメインスワッピング)<sup>16</sup> ことで、異なるアミノ酸をビルディングブロックとした NRP を合成している。また、mutasynthesis という NRP 誘導體合成法では、バンコマイシンの基質である非天然アミノ酸 3,5-dihydroxyphenylglycine の生合成遺伝子を不活性化したバンコマイシン生産株に対して 3,5-dihydroxyphenylglycine の代わりとなるアミノ酸を添加し培養することで、様々なアミノ酸をビルディングブロックとしたバンコマイシン誘導體が合成されることが知られている<sup>17</sup>。このようにして NRPS を用いた新規化合物の合成研究が行われており、異なるアミノ酸をビルディングブロックとしたペプチド性化合物の合成の可能性が報告されている。いずれの方法も A ドメインにおける基質認識を標的とする研究である。つまり、NRPS がどのような化合物を合成するのか評価を行う上で、A ドメインの基質特異性の解析が重要である。

そのため、これまでに A ドメインの機能解析方法が数多く開発されている (Figure 1-2)。その代表的な方法の一つは ATP-PP<sub>i</sub> アッセイである。これは A ド

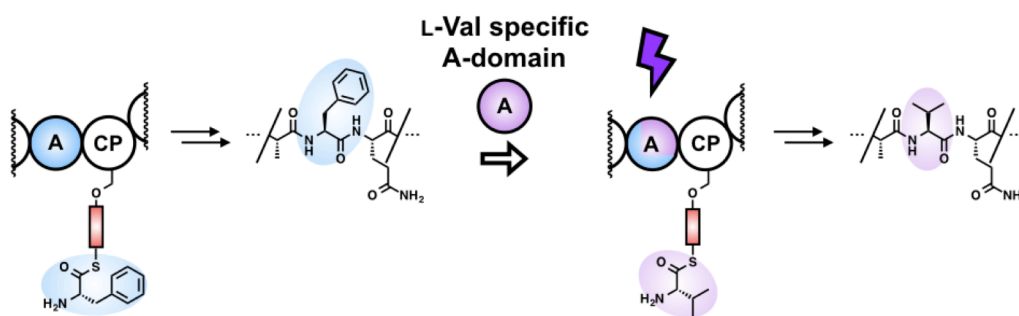
メインでの可逆的な酵素触媒反応を利用する方法である。 $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$  存在下で A ドメインでの酵素触媒反応により残った、または生成した $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ 、 $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  を測定することで、その基質特異性及び酵素活性を評価する<sup>18</sup>。同様に、放射性同位体を用いる方法として、標識化されたアミノ酸を利用し、そのアミノ酸の取り込みから評価する方法もある<sup>19</sup>。しかし、放射性同位体を用いるため、その取り扱いには注意を要する。MesG アッセイは A ドメインでの酵素反応で放出される $\text{PP}_i$ に着目し、その後の酵素反応による MesG の分解産物の吸光度を指標に A ドメインの基質特異性及び酵素活性を解析している<sup>20</sup>。この方法は現在広く用いられているが、反応速度が遅い反応を捉えることが難しい。同様に $\text{PP}_i$ に着目した測定方法にマラカイトグリーンを用いた方法もある<sup>21</sup>。また、基質が担持された NRPS モジュールを LC-MS/MS 解析することで、A ドメインが基質としたアミノ酸を解析する PPant ejection アッセイがある<sup>22</sup>。アミノ酸を担持しペプチド断片に消化した NRPS モジュールを LC-MS/MS 解析すると、各ペプチド断片の他に NRPS モジュールから PPant 部を伴って脱離した、PPant と担持されたアミノ酸がチオエステルした化合物の MS が観測できる。また、この化合物はさらにリン酸部の脱離した MS が観測される。この二段階の分子量の減少を伴う MS の分子量から、PPant 末端に担持されていた化合物の予測ができる。この方法は短時間で行え高感度であること、また、担持される基質だけではなく、酵素内で取り込まれ変換された反応中間体の解析も可能である。MS による解析方法として、 $\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4\text{-ATP}$  を用いるものもあり、迅速な解析ができる<sup>23</sup>。

しかし、ここまであげたこれら手法は精製されたタンパク質でのみ適用可能な A ドメインの基質特異性解析法であり、複数の A ドメインが含まれる NRPS モジュールでは解析できない。また、複数の A ドメインを含む NRPS や A ドメイン変異体、新規 NRPS の機能解析において、これまで一般的に行われてきた遺伝子工学的的手法による異種宿主発現での解析は困難である。なぜなら、NRPS は巨大なタンパク質であるため、全ての NRPS の発現ベクターを用意し、異種宿主による発現、精製したとしても酵素機能を維持している保証はない。そのため本研究では内在性 NRPS を含む夾雑系に適用可能な、簡便で迅速な NRPS の網羅的基質特異性解析方法を開発することとした。

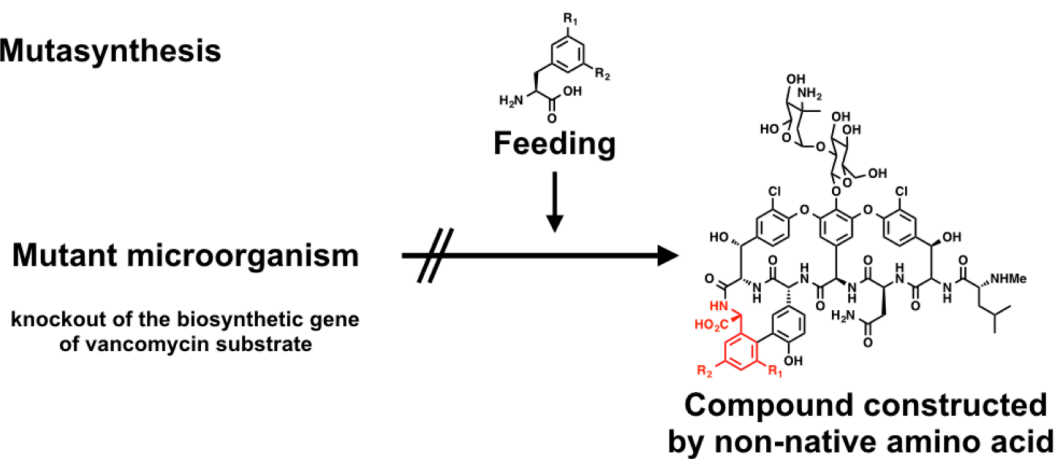
**- Metabolic engineering**



**- A-domain swapping**

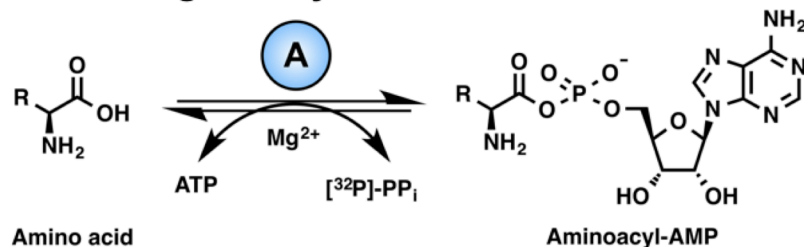


**- Mutasynthesis**

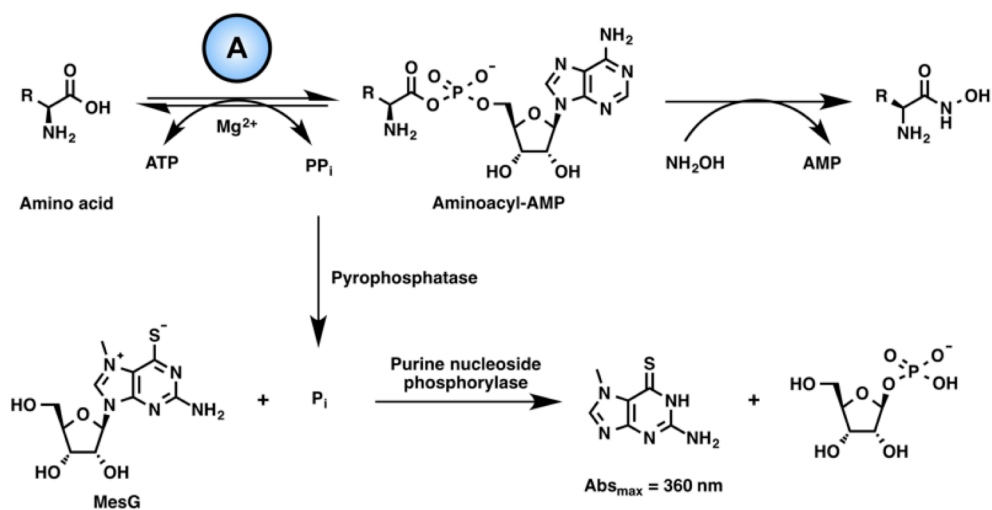


**Figure 1-1.** Introduction of non-natural amino acids into NRPs.

### - ATP-PP<sub>i</sub> exchange assay



### - MesG assay



### - PPant ejection assay

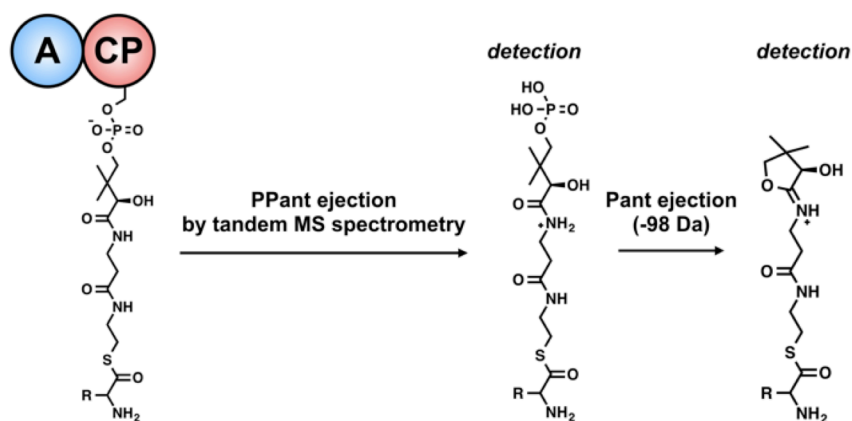


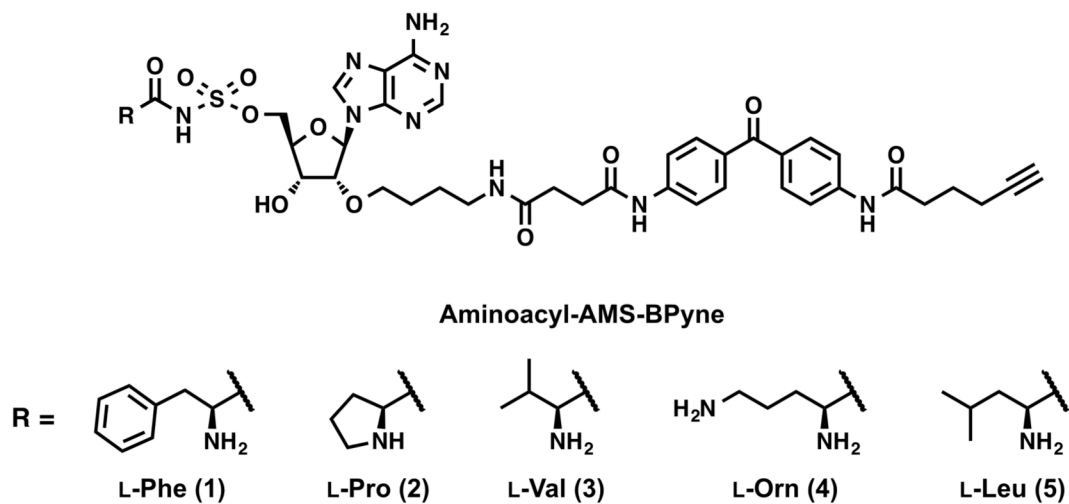
Figure 1-2. Methods to assess the enzymatic activities of the A-domains of NRPSs.

## 【競合的 activity-based protein profiling (ABPP) について】

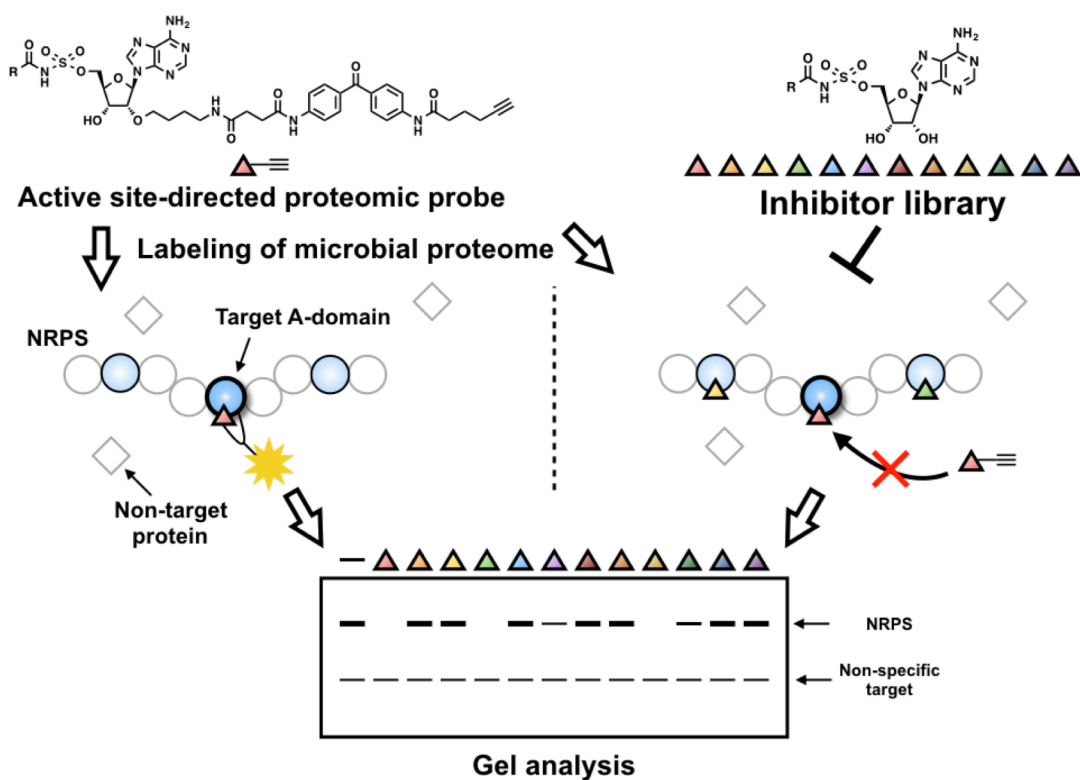
本研究では A ドメインの基質特異性解析法として、競合的 ABPP による解析法の確立を目指した。ABPP とは、酵素のメカニズムに依存し機能する化学プローブを用い、プロテオーム中から特定のタンパク質の検出やその酵素活性の評価を行う方法である<sup>24</sup>。当研究室では、生体内を含む夾雑系に適応可能な NRPS の A ドメインに対する活性部位指向型プローブ (aminoacyl-AMS-BPyne, **1-5**) を開発している (Figure 1-3)<sup>25</sup>。このプローブはアミノアシル-AMS をリガンドとしている。アミノアシル-AMS は A ドメインで合成される高反応性中間体であるアミノアシル-AMP の生物学的等価体であり、A ドメインに対して高い親和性を示す競合的阻害剤として知られている。アミノアシル-AMS は L-Ala-AMS のアデニンの 2 位 Cl 体として *Streptomyces* sp. から単離された ascamycin に由来する<sup>26</sup>。アミノアシル-tRNA 合成酵素は反応中間体としてアミノアシル-AMP を合成する。これまでに L-Gly や L-Ala、L-Thr などいくつかのアミノ酸型誘導体の合成、及びそのアミノアシル-tRNA 合成酵素阻害活性が示されている<sup>27, 28, 29</sup>。またアミノアシル-tRNA 合成酵素と同様にアミノアシル-AMP を合成する NRPS の A ドメインの阻害剤として報告されている<sup>30, 31</sup>。当研究室でも L-Phe-AMS、L-Pro-AMS、L-Val-AMS、L-Orn-AMS、L-Leu-AMS が活性部位指向型プローブと競合的に A ドメイン阻害活性を有することを示している<sup>25</sup>。アミノアシル-AMS のプローブ化にあたり、アミノアシル-AMS のアデノシンの 2' 位からリンカー部を伸長しており、ベンゾフェノン部と末端アルキン部を導入している。アミノアシル-AMS は A ドメインと共有結合を形成しない。そのため、光反応性をもつベンゾフェノンを導入することで UV 照射によって近接しているタンパク質と共有結合を形成する。そして、末端アルキンに Huisgen 環化付加反応によってタグ分子を導入することで、検出が可能となる。このプローブは夾雑系においてリガンド部のアミノ酸を入れ替えることで様々な内在性 NRPS の A ドメインを高選択的に検出可能である。

このプローブのリガンド部分に相当するアミノアシル-AMS は A ドメインに対する阻害剤である。アミノアシル-AMS もまた、側鎖部を種々のアミノ酸側鎖部と置換することで様々なアミノ酸を基質とする A ドメインの阻害剤を合成可能である。すなわち、各種アミノ酸側鎖部をもつアミノアシル-AMS を用いた A ドメイン阻害剤と A ドメインに対する活性部位指向型プローブを組み合わせた

競合的 ABPP を行うことで、微生物プロテオームに存在する様々な A ドメインの基質特異性を一度に網羅的に評価できると考えた (Figure 1-4)。そこで本研究では、新規化合物である L-Asn-AMS 及び L-Gln-AMS を加えた 19 種の天然アミノ酸及び L-Orn の側鎖部構造を有するアミノアシル-AMS による A ドメイン阻害剤ライブラリーを構築し、競合的 ABPP による本解析方法の評価を行うこととした (Scheme 1-1)。

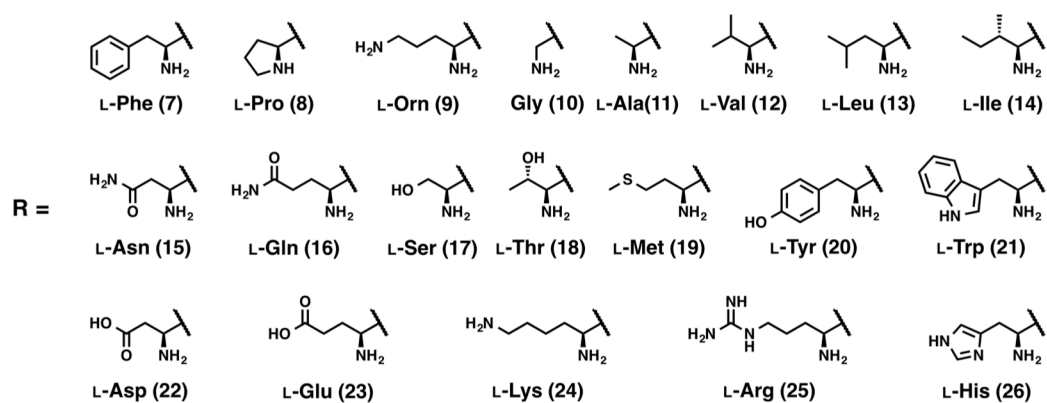
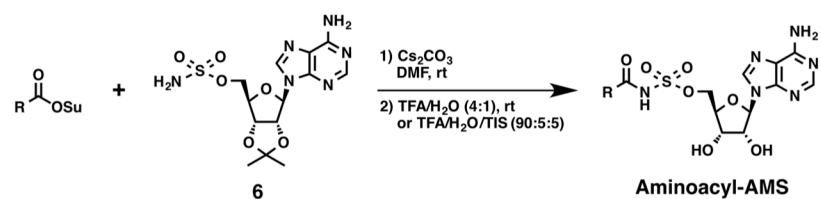


**Figure 1-3.** Structures of active site-directed proteomic probes for A-domains.



**Figure 1-4.** Functional profiling of the A-domains in NRPSs.





**Scheme 1-1.** Synthesis of aminoacyl-AMS inhibitors.

## 【アミノアシル-AMS を用いた A ドメイン阻害剤ライブラリーの合成】

はじめに、アミノアシル-AMS 阻害剤ライブラリーの構築を目的に 19 種の天然アミノ酸及び L-Orn の側鎖部構造をもつアミノアシル-AMS を合成した (Scheme 1-1)。これまでに、様々な側鎖部構造をもつアミノアシル-AMS がアミノアシル-tRNA 合成酵素および A ドメインの選択的阻害剤として合成されてきた。本研究では既存の合成方法の中から種々のアミノアシル-AMS の合成上汎用性が高いと判断した下記の合成方法で行った。

アデノシンを出発原料として既存の合成法を参考に、2',3'-アセトナイドスルファモイルアデノシン (6) を合成した<sup>27</sup>。合成したアデノシン誘導体 (6) と、Boc 基や Trt 基など酸性条件下で脱保護可能な保護基で保護された各種アミノ酸のスクシンイミドエステルを炭酸セシウム存在下、DMF 中で攪拌し縮合した<sup>31</sup>。得られた各種アミノアシル-AMS の保護体を TFA 中で脱保護し、目的の 20 種のアミノ酸の側鎖部構造を有するアミノアシル-AMS (7-26) を合成した。これにより、アミノアシル-AMS 阻害剤ライブラリーの構築を達成した。本合成方法はペプチド固相合成法に使われる保護基を用いて行っており、今回合成した 19 種の天然アミノ酸及び L-Orn 以外の非天然アミノ酸の側鎖部を有するアミノアシル-AMS の合成にも適用可能であることが期待される。

## 【内在性 GrsA を標的とした競合的 ABPP】

競合的 ABPP によって内在性 NRPS の A ドメインの基質特異性を評価可能であるか否かに関して検討を行った。その評価を行う対象として gramicidine S の生合成酵素を選択した (Figure 1-5)。Gramicidine S は *Aneurinibacillus migulanus* ATCC 9999 や DSM5759 が産生することが知られる NRP であり、二つの NRPS GrsA 及び GrsB によって生合成されるデカペプチドである。GrsA は A(L-Phe)-CP-E の三つのドメインを含む一つのモジュールによって構成され、その A ドメインは L-Phe を基質とする。また、GrsA はリコンビナントタンパク質として調製可能である。そこで、L-Phe-AMS-BPyne (1) とアミノアシル-AMS 阻害剤ライブラリーを用いて微生物が産生した内在性 GrsA 及びリコンビナント GrsA に対する競合的 ABPP を行い、その結果を比較することで評価を行った。

Gramicidine S を生産菌 *Aneurinibacillus migulanus* ATCC 9999 を培養し、その細胞抽出液に対して、合成した 20 種のアミノアシル-AMS 阻害剤 (各 100  $\mu$ M) をそれぞれ処理した。その後、L-Phe を基質とする A ドメインの活性部位指向型プローブ (**1**, 1  $\mu$ M) を作用させた (Figure 1-6)。365 nm の UV を照射し、標的タンパク質と共有結合を形成後、Huisgen 環化付加反応条件下でタグ分子として TAMRA-N<sub>3</sub> を付加した。SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、蛍光標識されたタンパク質を蛍光スキャナによって観察した (Figure 1-7)。その結果、5 つのアミノアシル-AMS [L-Phe-AMS (**7**), L-Leu-AMS (**13**), L-Met-AMS (**19**), L-Trp-AMS (**20**), L-His-AMS (**26**)] を作用させたレーンでプローブによる GrsA の標識化が阻害された。以上の結果から、内在性 GrsA の A ドメインに対して L-Phe-AMS (**7**)、L-Leu-AMS (**13**)、L-Met-AMS (**19**)、L-Trp-AMS (**21**) 及び L-His-AMS (**26**) は親和性を示すことが示唆された。

そこで、阻害が見られた 5 つのアミノアシル-AMS (**7**, **13**, **19**, **21**, **26**) と阻害が見られなかった L-Thr-AMS (**18**) と L-Lys-AMS (**24**) を用いて、各阻害剤濃度での競合的 ABPP による標識下の蛍光強度変化を観察し、そこから阻害剤の IC<sub>50</sub> を算出した (Figure 1-8)。その結果、IC<sub>50</sub> は L-Phe-AMS (**7**): 0.38  $\pm$  0.14  $\mu$ M、L-Leu-AMS (**13**): 23.0  $\pm$  0.12  $\mu$ M、L-Met-AMS (**19**): 27.2  $\pm$  0.22  $\mu$ M、L-Trp-AMS (**21**): 9.90  $\pm$  0.13  $\mu$ M、L-His-AMS (**26**): 126  $\pm$  0.18  $\mu$ M であった (Table 1-1)。L-Thr-AMS (**18**) と L-Lys-AMS (**24**) を用いた競合的 ABPP 実験の結果では、阻害剤濃度を 1 mM まで高くしても阻害が見られなかった。

内在性 GrsA に対する競合的 ABPP の結果を評価するため、リコンビナント GrsA を用いた競合的 ABPP の結果と比較することとした。調製したリコンビナント *holo*-GrsA に対して 20 種のアミノアシル-AMS (**7-26**) を作用させたのちに、L-Phe-AMS-BPyne (**1**) を作用させ、その標識化を検討した (Figure 1-9)。その結果、内在性 GrsA と同様に 5 つのアミノアシル-AMS [L-Phe-AMS (**7**)、L-Leu-AMS (**13**)、L-Met-AMS (**19**)、L-Trp-AMS (**21**)、L-His-AMS (**26**)] を作用させたレーンで L-Phe-AMS-BPyne (**1**) によるリコンビナント GrsA の標識化が阻害された。先と同様に L-Phe-AMS (**7**)、L-Leu-AMS (**13**)、L-Met-AMS (**19**)、L-Trp-AMS (**21**)、L-His-AMS (**26**) 及び阻害が見られなかった L-Thr-AMS (**18**)、L-Lys-AMS (**24**) を用いた阻害剤濃度による標識化の様子の変化から、競合的 ABPP によるリコンビナント GrsA に対する 7 つのアミノアシル-AMS の IC<sub>50</sub> を算出した (Figure 1-10)。その結果、IC<sub>50</sub> は L-Phe-AMS (**7**): 0.24  $\pm$  0.04  $\mu$ M、L-Leu-AMS (**13**): 10.0  $\pm$

0.11  $\mu$ M、L-Met-AMS (19): 9.86  $\pm$  0.09  $\mu$ M、L-Trp-AMS (21): 1.51  $\pm$  0.20  $\mu$ M、L-His-AMS (26): 49.9  $\pm$  0.27  $\mu$ Mであった (Table1-1)。内在性 GrsA を用いた結果と同様にL-Thr-AMS (18) 及びL-Lys-AMS (24) ではIC<sub>50</sub>を算出できなかった。内在性 GrsA とリコンビナント GrsA に対する競合的 ABPP から算出した各阻害剤の IC<sub>50</sub> の値を比較したところ、結果はよく一致した (L-Phe-AMS << L-Trp-AMS < L-Leu-AMS, L-Met-AMS < L-His-AMS << L-Thr-AMS, L-Lys-AMS)。

続いて、既存のAドメインの酵素活性測定方法であるMesGアッセイを用いたリコンビナントGrsAのAドメインの機能評価を行い、その結果と比較した (Table 1-2)。競合的ABPPの結果から、GrsAのAドメインが基質として認識する可能性が示された5つのアミノ酸 (L-Phe、L-Leu、L-Met、L-Trp、L-His) 及び阻害が見られなかった阻害剤のアミノ酸 (L-Thr、L-Lys) を選択して、解析を行った。競合的ABPPで用いているアミノアシル-AMSは、Aドメインで合成される酵素反応中間体を模倣したものである。そのため、酵素の基質に対する親和性を示すK<sub>m</sub>の値から比較を行った。得られたK<sub>m</sub>の値はL-Pheで24.8  $\mu$ Mである一方、L-Leu、L-Met、L-Trp、L-Hisは2.85 mM、18.5 mM、1.49 mM、17.5 mMであった。したがって、GrsAのAドメインは他のアミノ酸と比べL-Pheを厳密に基質として認識しているといえる。また、L-MetやL-Hisに比べL-LeuやL-TrpのK<sub>m</sub>の値は6倍から12倍ほど低く、L-ThrやL-LysのK<sub>m</sub>の値は測定した他のアミノ酸に比べてとても大きい、あるいは、測定不可能であった。この結果は内在性及びリコンビナントGrsAを用いた競合的ABPPでの結果とよく相関するものである (ABPP: L-Phe-AMS << L-Trp-AMS < L-Leu-AMS, L-Met-AMS < L-His-AMS << L-Thr-AMS, L-Lys-AMS, MesG: L-Phe-AMS << L-Trp-AMS < L-Leu-AMS < L-Met-AMS, L-His-AMS << L-Thr-AMS, L-Lys-AMS)。以上の結果から、競合的ABPPによるアミノ酸側鎖部の異なる各種アミノアシル-AMSのIC<sub>50</sub>の値の比較から、Aドメインの基質特異性を網羅的に評価可能であることが明らかとなった。

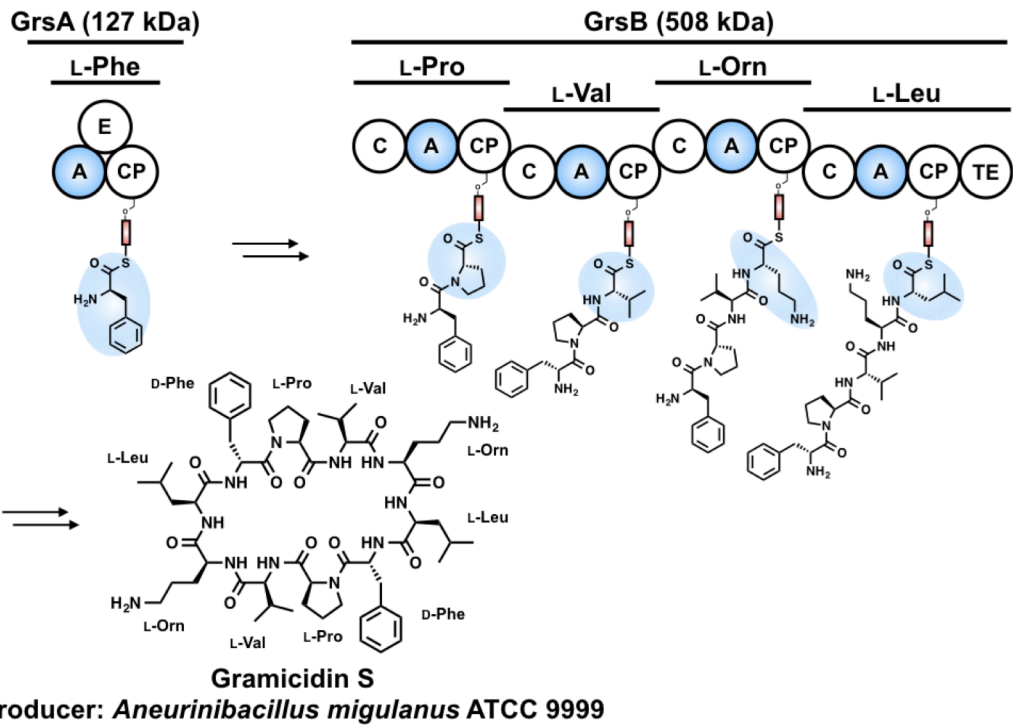


Figure 1-5. Biosynthetic pathway of gramicidin S.

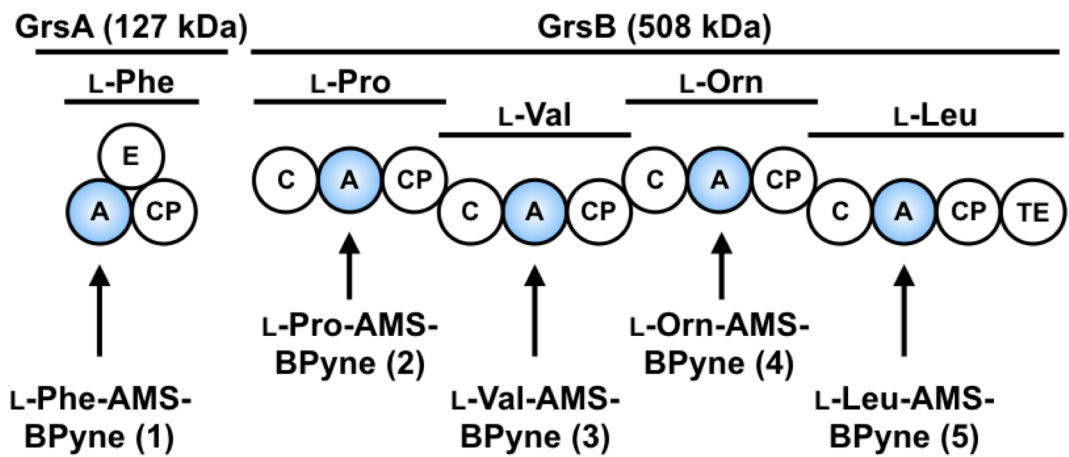
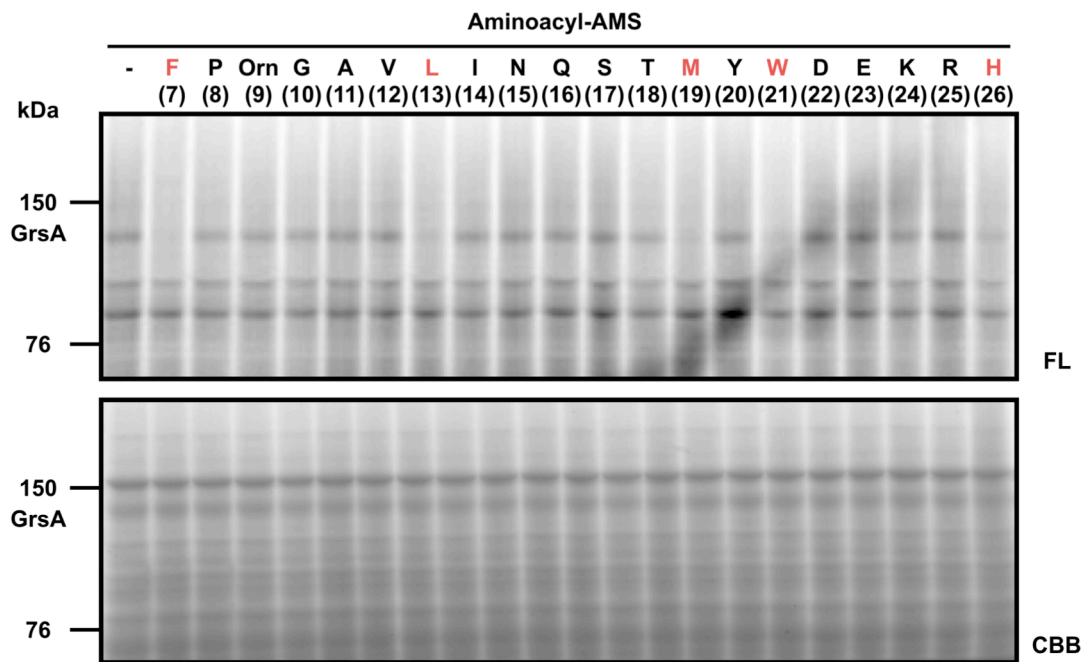
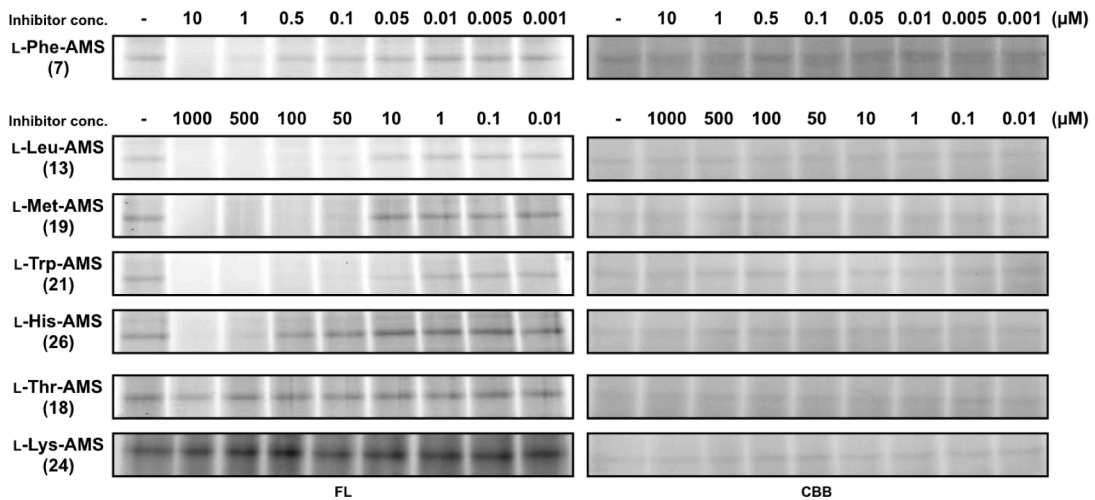


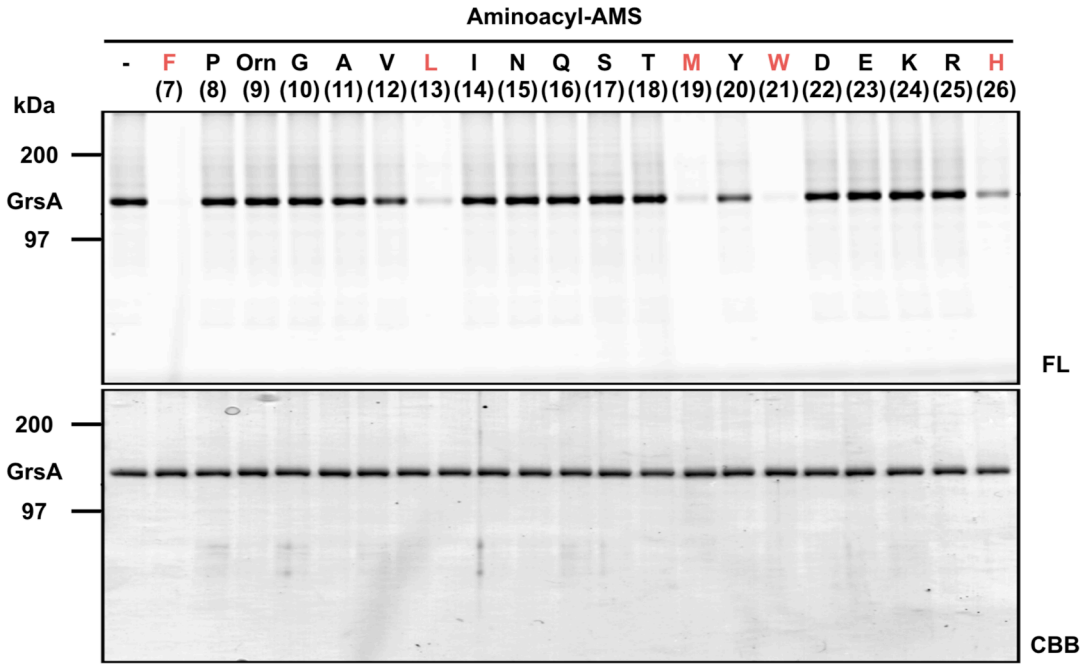
Figure 1-6. Active site-directed probes for the labeling of A-domains.



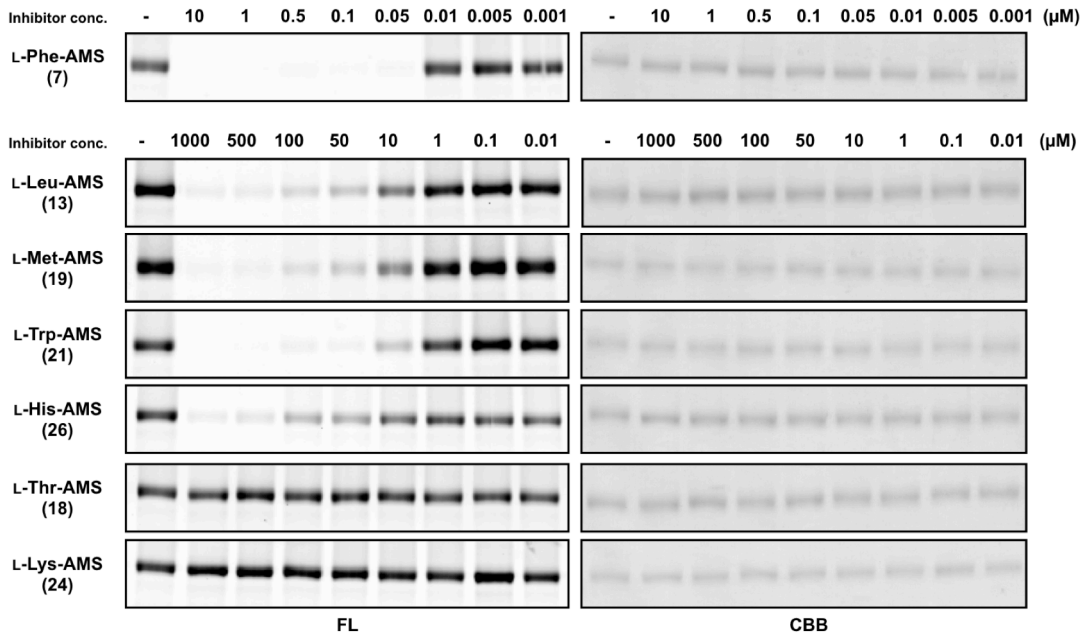
**Figure 1-7.** Competitive ABPP for the A-domain of endogenous GrsA. (Probe 1: 1  $\mu$ M, aminoacyl-AMS: 100  $\mu$ M)



**Figure 1-8.** Dose-response competitive ABPP for the A-domain of endogenous GrsA. (Probe 1: 1  $\mu$ M)



**Figure 1-9.** Competitive ABPP for the A-domain of the A-domain of recombinant GrsA. (Probe 1: 1  $\mu$ M, aminoacyl-AMS: 100  $\mu$ M)



**Figure 1-10.** Dose-response competitive ABPP for the A-domain of recombinant GrsA. (Probe 1: 1  $\mu$ M)

**Table 1-1.** Dose-response competitive ABPP experiments to assess the selectivity of L-Phe-AMS (7), L-Leu-AMS (8), L-Met-AMS (19), L-Trp-AMS (21), L-His-AMS (26), L-Thr-AMS (18) and L-Lys-AMS (24) toward the A-domains of endogenous and recombinant GrsA.

inhibitor	IC <sub>50</sub> (μM)	
	endogenous GrsA	recombinant GrsA
L-Phe-AMS	0.38 ± 0.14	0.24 ± 0.04
L-Leu-AMS	23.0 ± 0.12	10.0 ± 0.11
L-Met-AMS	27.2 ± 0.22	9.86 ± 0.09
L-Trp-AMS	9.90 ± 0.13	1.51 ± 0.20
L-His-AMS	126 ± 0.18	49.9 ± 0.27
L-Thr-AMS	n.d.	n.d.
L-Lys-AMS	n.d.	n.d.

n.d. = not detected.

**Table 1-2.** Catalytic parameters of the adenylation reaction catalyzed by the A-domain of recombinant GrsA<sup>a</sup>.

substrate	<i>k</i> <sub>cat</sub> [min <sup>-1</sup> ]	<i>K</i> <sub>m</sub> [mM]	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]
L-Phe	500 ± 12	0.0248 ± 0.0023	20161 ± 5217
L-Leu	5.09 ± 0.40	2.85 ± 0.57	1.79 ± 0.71
L-Met	35.8 ± 2.1	18.5 ± 3.3	1.92 ± 0.17
L-Trp	5.98 ± 0.43	1.49 ± 0.19	4.02 ± 2.2
L-His	1.56 ± 0.09	17.5 ± 3.0	0.089 ± 0.0037
L-Thr	2.51 ± 0.39	246 ± 69	0.011 ± 0.0007
L-Lys	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kinetic parameters were determined by a coupled hydroxamate-MesG continuous spectrophotometric assay.

Errors were given as the standard deviation of multiple independent measurements. <sup>b</sup> n.d. = not detected.



## 【GrsB を用いた内在性 NRPS の競合的 ABPP による評価について】

次に GrsB を用いた競合的 ABPP による検討を行った。GrsB は 4 つのモジュールによって構成される NRPS であり、そのため 4 つの A ドメインをもつ 508 kDa の巨大タンパク質である。それぞれの A ドメインは、L-Pro、L-Val、L-Orn、L-Leu を基質として認識することが知られている。そこで、4 種の各 A ドメインに対する活性部位指向型プローブ (2, 3, 4, 5) を用いてそれぞれの A ドメインに対する競合的 ABPP を行った (Figure 1-11)。 *Aneurinibacillus migulanus* DSM 5759 の細胞抽出液に対して先と同様の操作を行った。

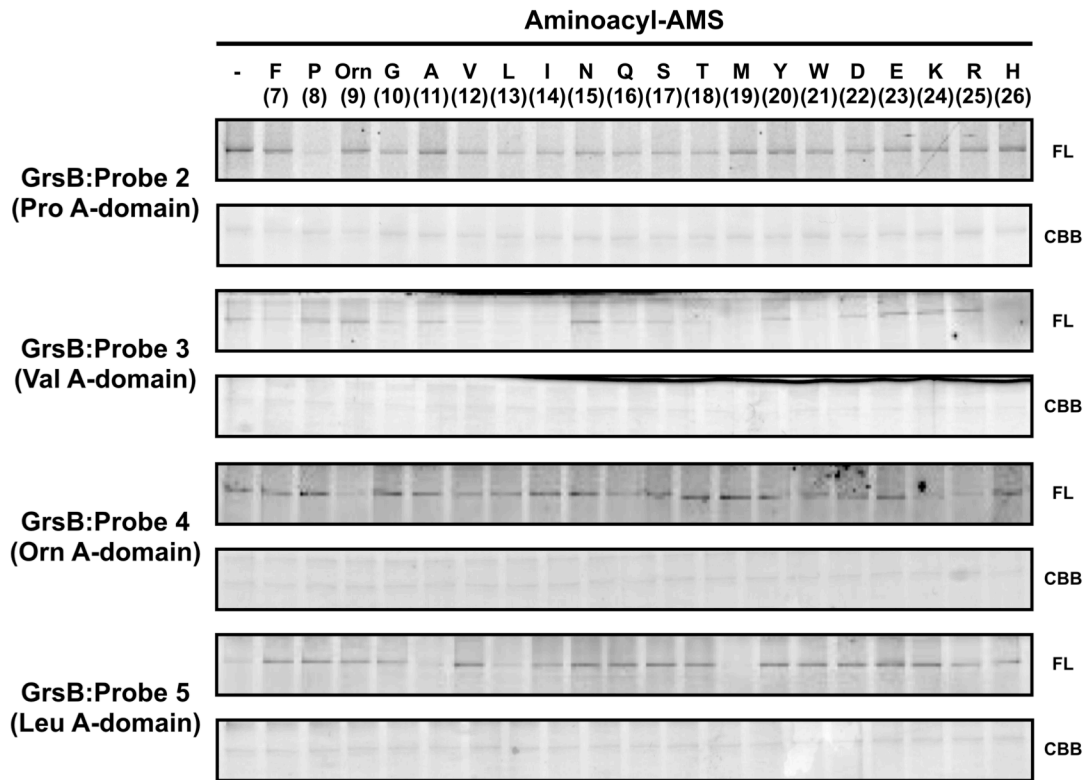
L-Pro-AMS-BPyne (2) を用いた結果、GrsB が標識化され、L-Pro-AMS (8) でのみその標識化の阻害が見られた。GrsA の時と同様に、内在性 GrsB に対して L-Pro-AMS (8) 及び阻害が見られなかった L-Orn-AMS (9)、L-Gln-AMS (16) を用いた阻害活性の評価を行った (Figure 1-12)。その結果、L-Pro-AMS (8) の IC<sub>50</sub> は 0.29 ± 0.09 μM であった (Table 1-3)。一方、L-Orn-AMS (9) 及び L-Gln-AMS (16) は全く阻害が見られなかった。この結果を GrsB の一つ目のモジュールと同様、L-Pro を基質とする A ドメインを含む tyrocidine の NRPS モジュールであるリコンビナント TycB<sub>1</sub> を用いた競合的 ABPP の結果と比較した (Figure 1-13 and 14, Table 1-3)。その結果、内在性 GrsB とリコンビナント TycB<sub>1</sub> に対する L-Pro-AMS の IC<sub>50</sub> はよく一致した。これら A ドメインは相同性が高いことが知られていることから、この競合的 ABPP による評価が妥当であることがわかる<sup>13,27</sup>。

L-Orn-AMS-BPyne (4) を用いた結果、L-Orn-AMS (9) の他に L-Gln-AMS (16)、L-Lys-AMS (24)、L-Arg-AMS (25) でも中程度の阻害が観察された (Figure 1-11)。各阻害剤の IC<sub>50</sub> は L-Orn-AMS (9): 18.5 ± 2.6 nM, L-Gln-AMS (16): 139 ± 0.33 μM, L-Lys-AMS (24): 8.2 ± 0.14 μM, L-Arg-AMS (25): 4.6 ± 0.15 μM であった (Figure 1-15, Table 1-4)。L-Orn を基質とする A ドメインの A ドメインコードの中で、278 番目の Glu 残基と 322 番目の Ser 残基が基質認識に重要であることが知られている (Figure 1-18)<sup>32</sup>。Glu のカルボキシ基が活性部位の中で静電相互作用することで、基質となる Orn と高い親和性を示す。HSAF は *Lysobacter enzymogenes* が産生する NRP であり、そのビルディングブロックに L-Orn を含む<sup>33</sup>。その HSAF 生合成酵素の L-Orn を基質とする A ドメインが L-Orn の他に L-Lys に対しても触媒活性をもつことが知られている。そのため、本研究で阻害が見られた L-Lys-AMS (24)、L-Arg-AMS (25) も L-Orn-AMS (9) 同様、活性部位で Glu

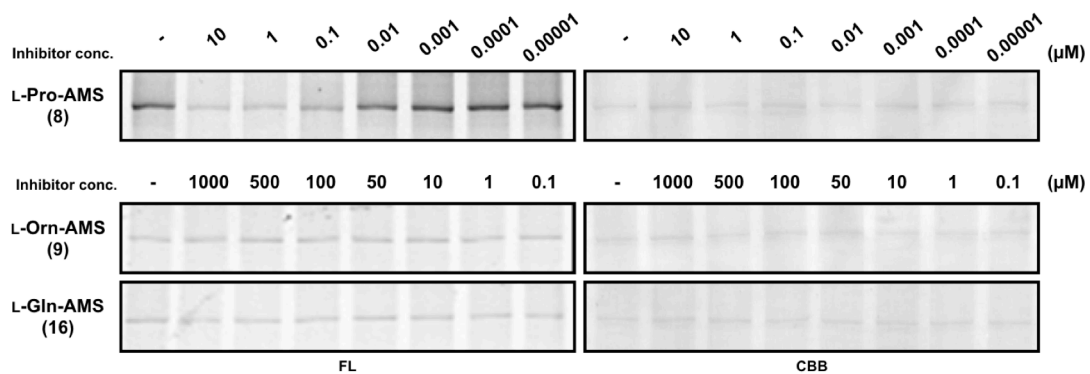
と静電相互作用を示すことで阻害が見られたと考えられた。したがって、GrsB の L-Orn を基質とする A ドメインも、L-Orn、L-Lys、L-Gln 及び L-Arg を基質して認識することが示唆された。

L-Val-AMS-BPyne (3) 及び L-Leu-AMS-BPyne (5) を用いた結果、3 では L-Val-AMS (12) の他に L-Leu-AMS (13)、L-Ile-AMS (14)、L-Met-AMS (19)、L-Trp-AMS (21)、L-His-AMS (26) でも阻害が観察され、5 では L-Leu-AMS (13) の他に L-Ala-AMS (11)、L-Met-AMS (19) でも阻害が観察された (Figure 1-11)。L-Val を基質とする A ドメインに対する各阻害剤の IC<sub>50</sub> は L-Val-AMS (12): 0.11 ± 0.04 μM, L-Leu-AMS (13): 2.8 ± 0.23 μM, L-Ile-AMS (14): 6.0 ± 0.10 μM, L-Met-AMS (19): 0.42 ± 0.08 μM, L-Trp-AMS (20): 0.65 ± 0.04 μM, L-His-AMS (26): 2.2 ± 0.28 μM であった (Figure 1-16, Table 1-5)。一方の L-Leu を基質とする A ドメインに対する各阻害剤の IC<sub>50</sub> は L-Leu-AMS (13): 1.7 ± 0.09 nM, L-Met-AMS (19): 2.7 ± 0.22 μM であり、L-Ala-AMS (11) では阻害の様子は観察されなかった (Figure 1-17, Table 1-6)。以上の結果から、L-Val、L-Leu を基質とする A ドメインは実際に基質とするアミノ酸以外にも認識していると示唆された。これら A ドメインは極性アミノ酸に基質特異性を有する A ドメインと比べ、疎水性相互作用によってアミノ酸を認識しているため、選択性が低いと考えられる。確かに surfactin A の NRPS である SrfA-A、SrfA-B、SrfA-C の L-Leu を基質とする A ドメインが、低い触媒活性ながら L-Val と L-Ile を基質とすることが知られており<sup>34</sup>、SrfA-B の L-Val を基質とする A ドメインもまた、L-Ile をわずかながら基質として認識する<sup>35</sup>。そのため、競合的 ABPP によって本来の基質とは異なるアミノ酸側鎖部のアミノアシル-AMS でも阻害活性が見られたと考えられる。

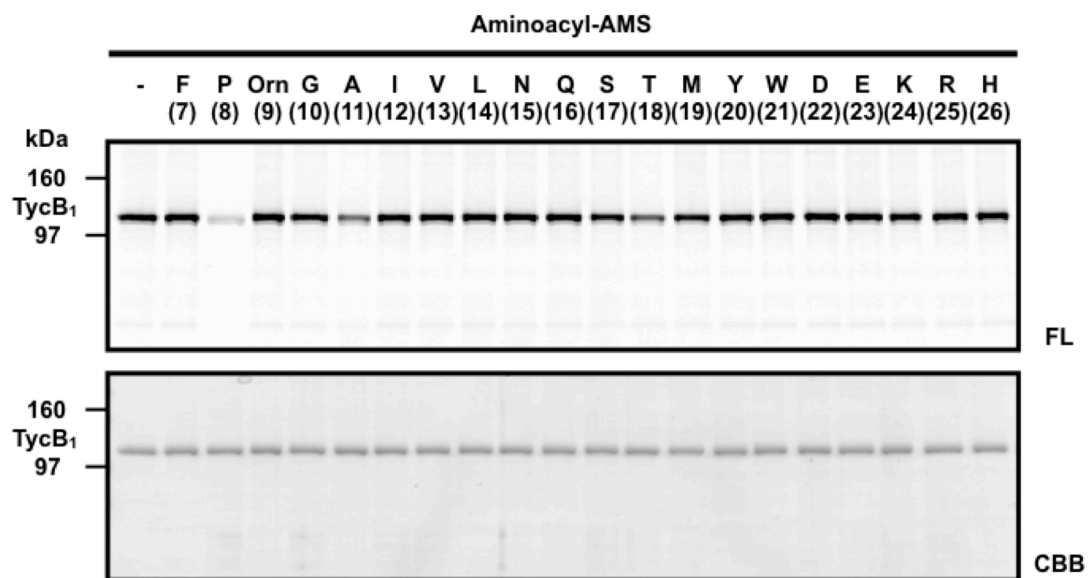
競合的 ABPP による A ドメインの網羅的機能解析技術と遺伝子工学的手法を組み合わせることで、A ドメインの基質認識の機構を明らかにする手がかりになることが期待される。



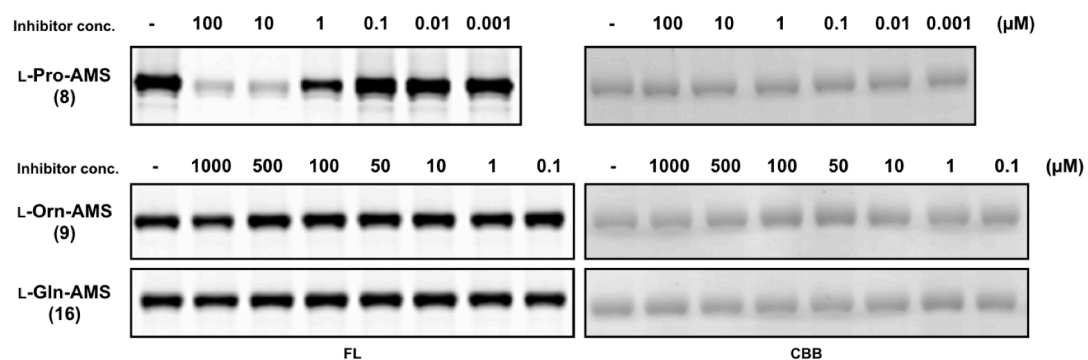
**Figure 1-11.** Competitive ABPP for the A-domain of endogenous GrsB. (Probe: 1  $\mu$ M, aminoacyl-AMS: 100  $\mu$ M)



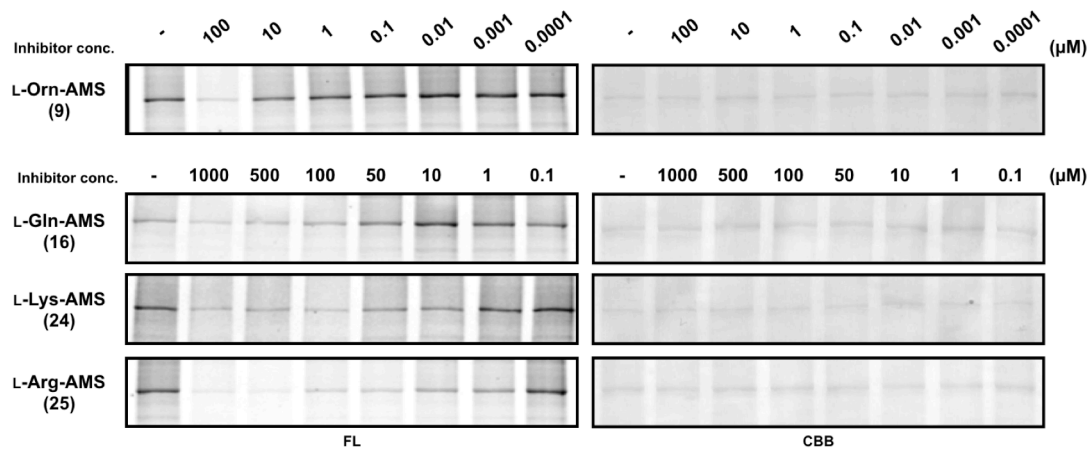
**Figure 1-12.** Dose-response competitive ABPP for the L-Pro-activating domain of endogenous GrsB. (Probe 2: 1  $\mu$ M)



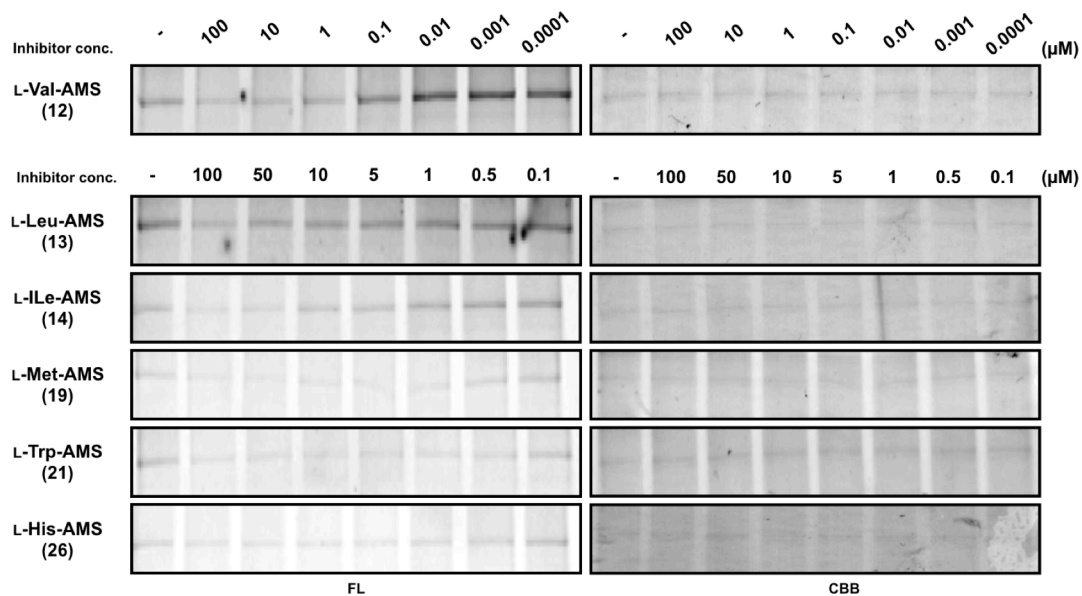
**Figure 1-13.** Competitive ABPP for the A-domain of recombinant TycB<sub>1</sub>. (Probe 2: 1 μM, aminoacyl-AMS: 100 μM)



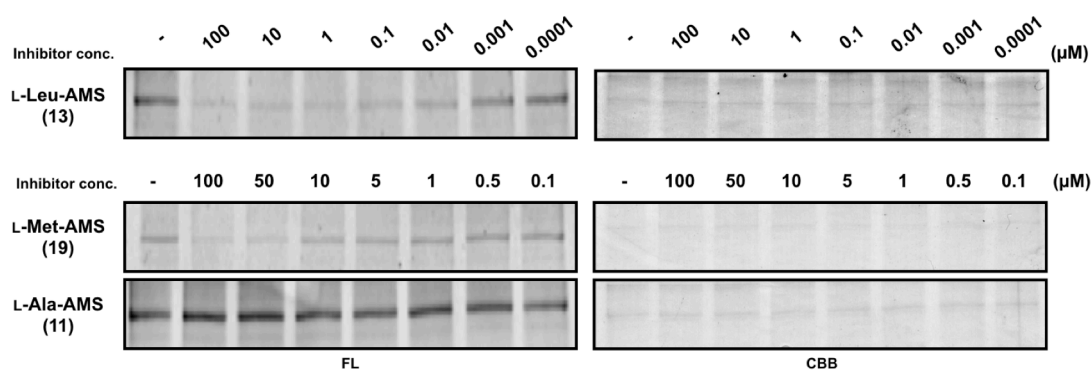
**Figure 1-14.** Dose-response competitive ABPP for the A-domain of recombinant TycB<sub>1</sub>. (Probe 2: 1 μM)



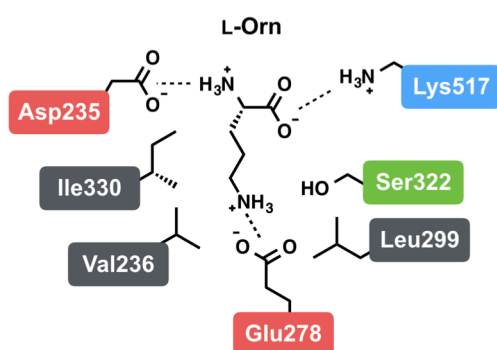
**Figure 1-15.** Competitive ABPP for the A-domain of the L-Orn-activating domain of endogenous GrsB. (Probe 4: 1  $\mu$ M)



**Figure 1-16.** Competitive ABPP for the A-domain of the L-Val-activating domain of endogenous GrsB. (Probe 3: 1  $\mu$ M)



**Figure 1-17.** Competitive ABPP for the A-domain of the L-Leu-activating domain of endogenous GrsB. (Probe **5**: 1  $\mu$ M)



**Figure 1-18.** Predicted structure for the specificity pocket of L-Orn-activating A-domain.

**Table 1-3.** Dose-response competitive ABPP experiments to assess the selectivity of L-Pro-AMS (**8**) toward the L-Pro-activating domain of endogenous GrsB and recombinant TycB<sub>1</sub>.

inhibitor	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	endogenous GrsB (L-Pro-activating domain)	recombinant TycB <sub>1</sub>
L-Pro-AMS	0.29 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.20

**Table 1-4.** Dose-response competitive ABPP experiments to assess the selectivity of L-Orn-AMS (**9**), L-Gln-AMS (**16**), L-Lys-AMS (**24**) and L-Arg-AMS (**25**) toward the L-Orn-activating domain of endogenous GrsB.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (μM)
	endogenous GrsB (L-Orn-activating domain)
L-Orn-AMS	<b>0.0185 ± 0.0026</b>
L-Gln-AMS	<b>139 ± 0.33</b>
L-Lys-AMS	<b>8.2 ± 0.14</b>
L-Arg-AMS	<b>4.6 ± 0.15</b>

**Table 1-5.** Dose-response competitive ABPP experiments to assess the selectivity of L-Val-AMS (**12**), L-Leu-AMS (**13**), L-Ile-AMS (**14**), L-Met-AMS (**19**), L-Trp-AMS (**21**) and L-His-AMS (**26**) toward the L-Orn-activating domain of endogenous GrsB.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (μM)
	endogenous GrsB (L-Val-activating domain)
L-Val-AMS	<b>0.11 ± 0.04</b>
L-Leu-AMS	<b>2.8 ± 0.23</b>
L-Ile-AMS	<b>6.0 ± 0.10</b>
L-Met-AMS	<b>0.42 ± 0.08</b>
L-Trp-AMS	<b>0.65 ± 0.04</b>
L-His-AMS	<b>2.2 ± 0.28</b>

**Table 1-6.** Dose-response competitive ABPP experiments to assess the selectivity of L-Leu-AMS (**13**) and L-Met-AMS (**19**) toward the L-Leu-activating domain of endogenous GrsB.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (μM)
	endogenous GrsB (L-Leu-activating domain)
L-Leu-AMS	<b>0.0017 ± 0.00009</b>
L-Met-AMS	<b>2.7 ± 0.22</b>

## 【第一章の小括】

本章では新たな内在性 NRPS に適用可能な A ドメインの基質特異性解析方法として、競合的 ABPP の開発を行った。A ドメインの活性部位選択的阻害剤であるアミノアシル-AMS ライブラリーを構築して、A ドメインに対する活性部位指向型プローブと組み合わせることで各 A ドメインに対する評価を行った。内在性及びリコンビナント NRPS を用いた競合的 ABPP 及び既存の基質特異性解析方法である MesG アッセイによる結果を比較検討したところ、本研究で開発した競合的 ABPP は内在性 NRPS に対して簡便に、その基質特異性の評価が可能であることを明らかにした。本法は既存の A ドメインの基質特異性及び酵素活性評価法とは異なり、夾雑系において特定の A ドメインの解析が可能である。そのため、これまで解析が困難であった複数の A ドメインが含まれる NRPS の A ドメインを個別に評価可能である。また、本法は SDS-PAGE によるタンパク質の分離とその蛍光標識化の観察による簡便な解析ができ、多様な側鎖部構造を有するアミノアシル-AMS を用いることで一度に複数のアミノ酸に対する基質特異性を評価可能である。

本法は夾雑系において内在性 NRPS に適用可能な新規 A ドメインの基質特異性評価方法である。新たに見つかった内在性 NRPS や組み替え NRPS モジュールの迅速で簡便、かつ網羅的な A ドメインの基質特異性解析が可能となる。本法は遺伝子工学的手法との相補的な活用により、A ドメインの基質認識機構及び機能の詳細な解析に役立つことが期待される。



## 第二章

### NRPS 担体タンパク質 (CP) の翻訳後修飾を標的とした分子ツールの開発

病原性因子として NRP を産生する病原細菌に対しては、NRPS の機能を制御することが新規抗菌薬として有効な手段であるといえる<sup>36</sup>。これまでに見つけてきた NRP の中には病原細菌にとって病原性因子として必要不可欠な役割を果たすものがある。これら微生物の二次代謝経路の阻害は病原細菌の病原性発現の抑止に効果を発揮できる (Figure 2-1)<sup>37, 38, 39, 40</sup>。そのため、これまでに病原細菌の二次代謝をターゲットとした創薬研究が行われている。二次代謝経路の活性化において、NRPS の CP への翻訳後修飾が必須であることが知られている<sup>41</sup>。したがって、その翻訳後修飾を導入する酵素は新規抗菌薬開発における有効な標的分子であるといえる。そこで、微生物内における NRPS の翻訳後修飾を直接解析する手段を開発することで、新規抗菌薬の開発に向けた創薬基盤が構築可能である。

これまでに、翻訳後修飾酵素である PPTase によって NRPS の CP に翻訳後修飾された PPant の検出方法が開発されている (Figure 2-2)。その一つとして、PPant 末端のチオール基の求核性を利用したマイケルアクセプター試薬による標識化がある<sup>42</sup>。一旦ビルディングブロックとなるアミノ酸によって CP 上の PPant 末端をチオエステル結合によってマスクした後に、マイケルアクセプター試薬としてマレイミドを作用させ、すべてのチオール基をマスクする。そしてチオエステル基を加水分解し、再度放射性同位体標識されたマイケルアクセプター試薬をアミノ酸でマスクしていたチオール基と反応させる。このようにして、Aドメインが基質として取り込んだアミノ酸とチオエステル結合を形成する PPant を放射性同位体標識化する方法である。この方法は NRPS に対して多量の試薬処理が必要であり、チオエステル基の不安定さから特異性が低く、放射性同位体を用いるため取り扱いに注意を要する、といった問題点がある。また、蛍光標識化による検出方法が報告されている。翻訳後修飾された *holo*-NRPS モジュールをホスホジエステラーゼである AcpH、または HF によって一度 *apo* 化した後に、蛍光標識化 CoA と PPTase である *Bacillus subtilis* 由来の Sfp によって *apo*-CP に蛍光標識化分子を導入する方法である<sup>43, 44, 45</sup>。この方法は高感度である一方で、*apo* 化の際に酵素処理による基質制限や HF 処理による酵素活性の消

失が問題点として挙げられる。さらに、いずれの方法も精製されたタンパク質を用いてのみ解析可能な方法であり生体内での翻訳後修飾を直接的に検出することはできない。また、生体内の NRPS の CP は全て PPant 化されている。既存の方法ではそれら複数の CP を厳密に識別し検出することができない。そのため、本研究では内在性 NRPS を用いた直接的な CP の翻訳後修飾の検出を可能とする分子ツールの開発を行うこととした。

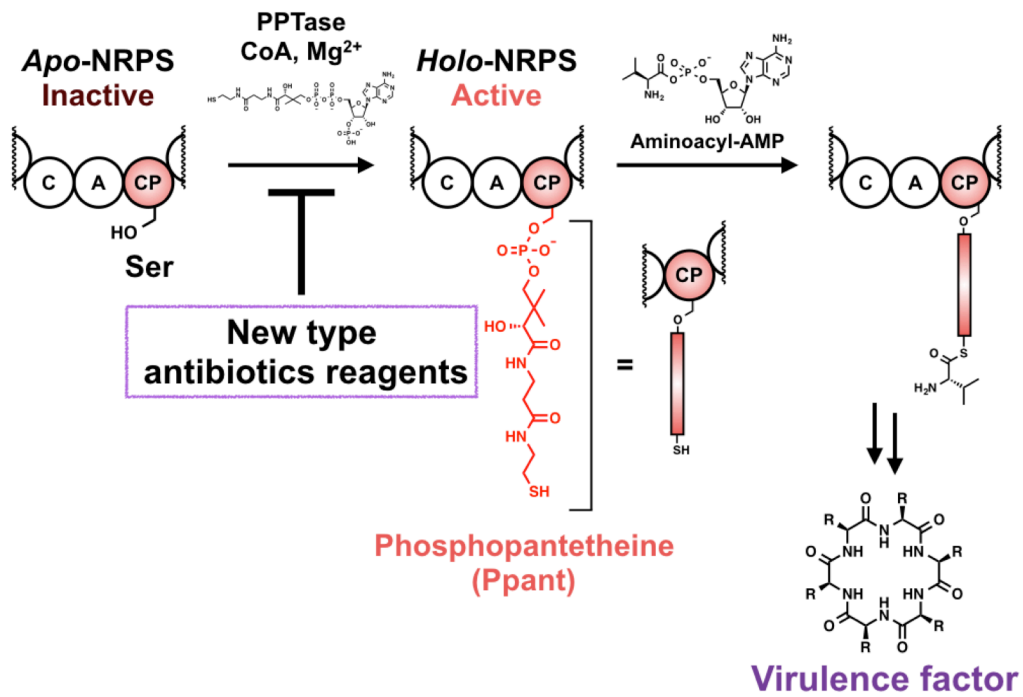


Figure 2-1. Post-translational modification of CP motif in NRPS.

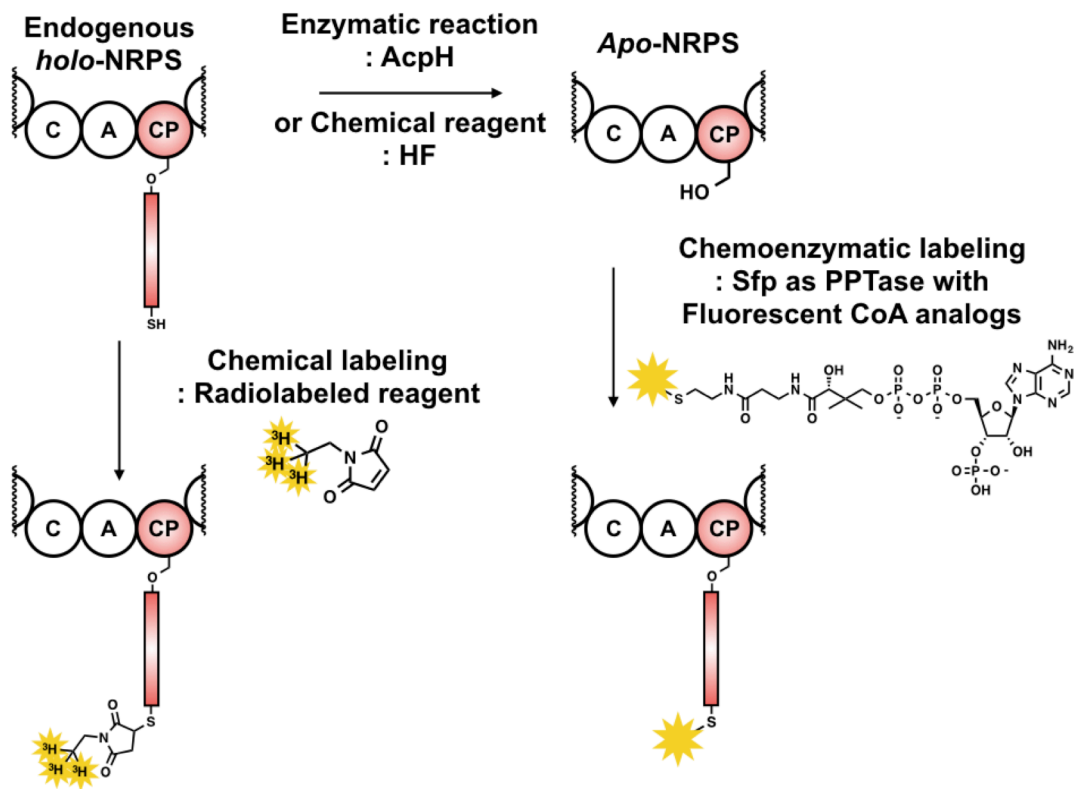


Figure 2-2. Analytical methods of CP motif in NRPS.

## 【NRPS の CP の翻訳後修飾を選択的に検出するプローブの設計】

NRPS の CP の翻訳後修飾を選択的に検出する分子ツールの設計を行った (Figure 2-3)。NRPS の A ドメイン及び CP での特徴的な酵素触媒反応を利用することとした (Figure 3)。A ドメインでは生体内プールから特異的に選択したアミノ酸と ATP からアミノアシル-AMP を合成する。隣接する CP に翻訳後修飾として付加された PPant 末端のチオール基が活性化されたアミノアシル-AMP のアシル基に対して求核攻撃する。これにより CP とビルディングブロックであるアミノ酸がチオエステル結合を形成することで、NRP にアミノ酸が担持され NRP 合成に利用される。本研究では、この A ドメインと CP 間で起こる酵素触媒反応を利用した CP の翻訳後修飾を選択的に検出する分子プローブを設計した。

まずリガンドの基本構造として、NRPS の A ドメインによって触媒されるアミノ酸のアデニル化反応の反応中間体であるアミノアシル-AMP を選択した。アミノアシル-AMP を模倣することで、NRPS の A ドメインと親和性を示すと考えた。A ドメインによって合成されたアミノアシル-AMP の活性化されたアシル基に対して、隣接する CP 上の PPant 末端のチオール基が求核攻撃する。そこで、リガンドの分子にとってアミノアシル-AMP のアシル部に相当する位置に、マイケルアクセプターを導入することとした。そのマイケルアクセプターとして本研究ではビニルスルホンアミド基を選択した。スルホンアミド部がリン酸と同様の四面体構造をとるため、A ドメインに基質として認識されると考えた。また、ビニルスルホンアミド基は他のマイケルアクセプターであるエノンやビニルアミド、ビニルエステル、ビニルスルホンなどと比べて求電子性が低いことが知られている<sup>46</sup>。これにより、夾雑系における非特異的な求核性残基を持つタンパク質の標識化が抑えられることを期待した。以上のことから、リガンドが A ドメインと親和性を示すこと、そして、マイケルアクセプターが PPant 末端のチオール基と酵素触媒反応によって共有結合を形成することで標識化が進行すると考えた。

最後に、ターゲット分子と共有結合を形成したリガンドの検出を目的として、アデノシンの 2' 位から末端アルキンを伸長することとした。これまでに A ドメインに対する活性部位指向型プローブの開発から、アデノシンへの 2' 位へのリンカーの導入は許容されることが判明している<sup>25, 47</sup>。そのため、リンカー部の伸長箇所として最適であると判断した。また、プローブ分子の合成上、修飾を

導入しやすいという利点があり、アデノシンの2'位からリンカー部を伸長した。そのリンカー部として短鎖の末端アルキンを選択した。短鎖の末端アルキンを導入することでリガンドの認識を大きく変えないことが期待される。また、Huisgen 環化付加反応によってタンパク質と作用させた後に様々なタグ分子を導入でき、種々の解析に用いることができる。そのため、本研究では末端アルキン部をアデノシンの2'位に導入することとした。

本研究では、L-Val のアミノ酸側鎖部を有するプローブ **27** を設計した。プローブ **27** は夾雑系においてL-Val を基質とする NRPS の A ドメインの活性部位に結合し、隣接する CP の PPant と共有結合を形成することにより特異的に CP の標識化が可能であると推測した (Figure 2-4)。

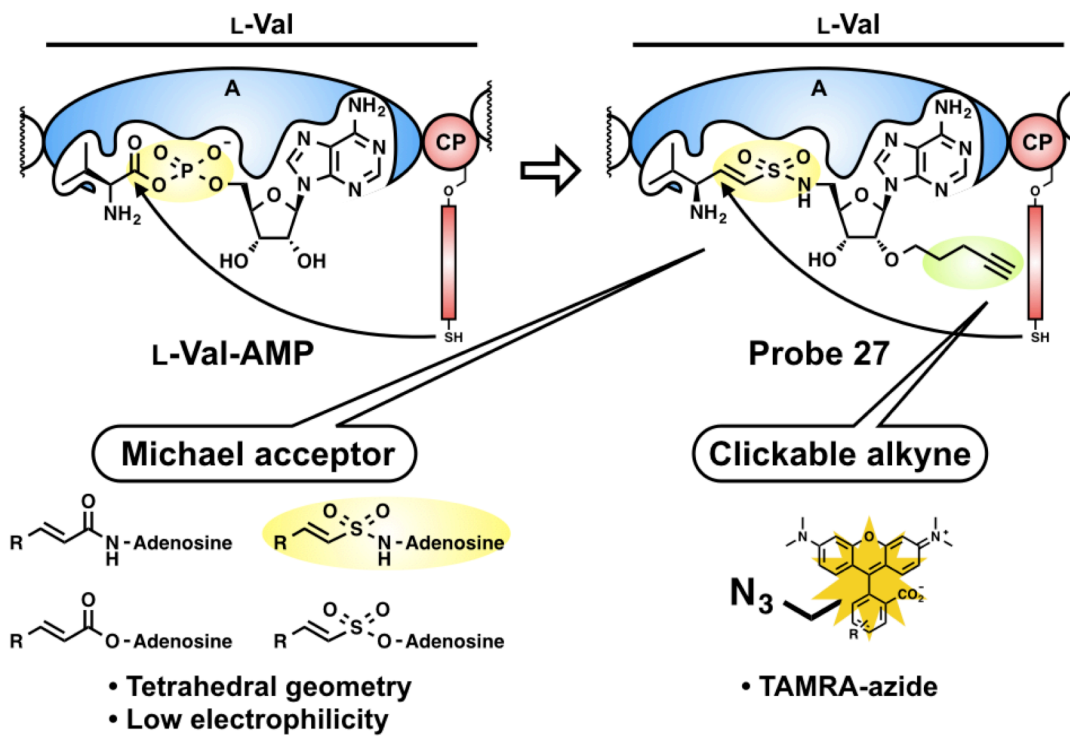


Figure 2-3. Design of probe 27 for native CP-motif in NRPS.

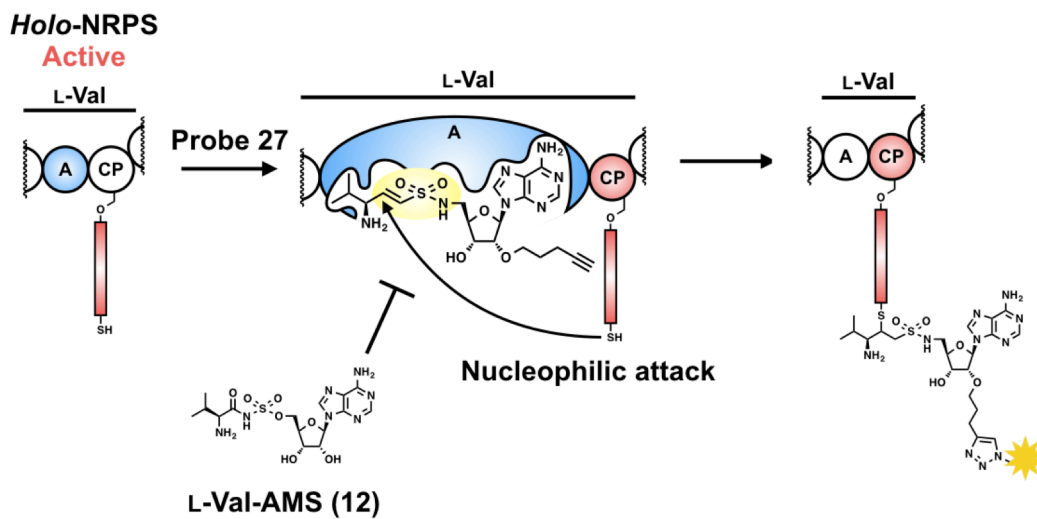


Figure 2-4. Labeling strategy of native CP-motif by probe 27.

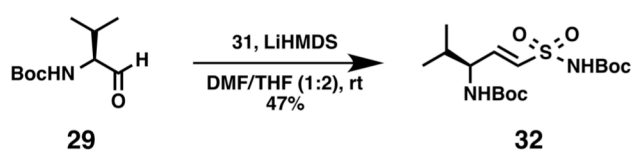
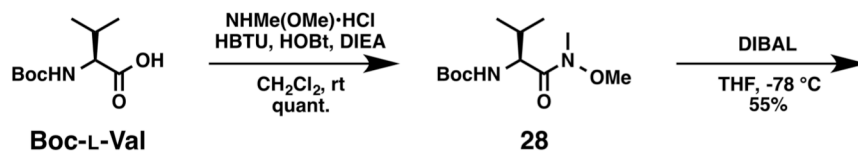
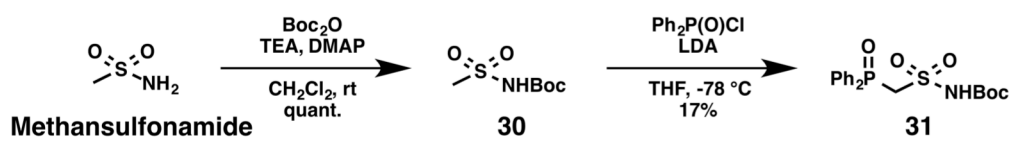
## 【プローブ 27 の合成】

設計した L-Val のアミノ酸側鎖部構造をもつビニルスルホンアミドアデノシンをリガンドとするプローブ 27 の合成を行った。ビニルスルホンアミド部 (32) とアデノシン部 (35) の二つのフラグメントをそれぞれ合成し、最終段階で縮合することで目的のプローブを合成することとした。

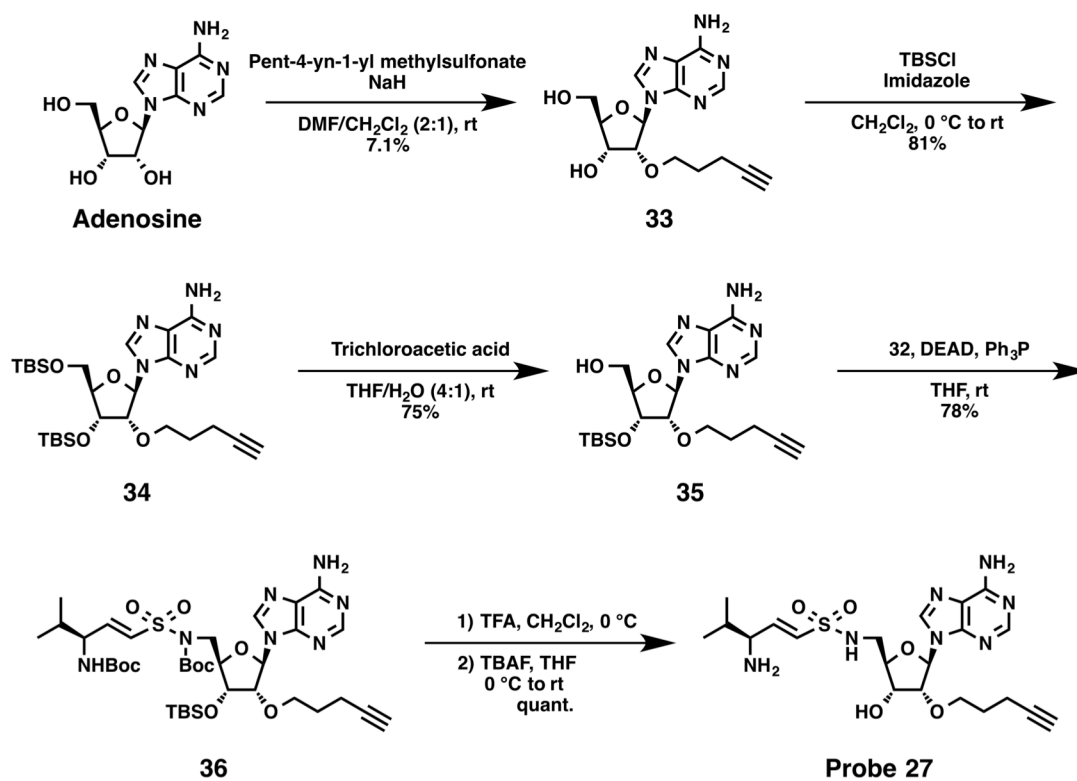
まず、ビニルスルホンアミド部 (32) の合成を行った (Scheme 2-1)。Boc-L-Val を出発原料として、ワインレブアミド化の後、DIBAL を $-78^{\circ}\text{C}$  条件下で作用させることで、アルデヒド体 29 へと誘導した。続いて活性メチレン化合物 31 の合成を行った<sup>48</sup>。メタンスルホンアミドを出発物質とし、窒素原子を Boc 基で保護した。得られた化合物 30 に対して LDA を作用させ、ジフェニルホスフィン酸クロリドに対して求核置換反応することで、活性メチレン化合物 31 を合成した。得られた活性メチレン化合物 31 と先の L-Val のアルデヒド誘導體 29 を Horner-Wadsworth-Emmons 反応で縮合し、オレフィン部を合成した。これによって目的の L-Val の側鎖部をもつビニルスルホンアミド体 32 を得た。

次に、アデノシン部 (35) の合成を行った (Scheme 2-2)。アデノシンを強塩基条件下、メタンスルホン酸 4-ペンチニルエステルを用いた求核置換反応によって 2'-ペンチニル化体 33 を得た。次に 3',5'-水酸基を TBS 基で保護した後に、トリクロロ酢酸によって 5'位選択的に脱保護し、縮合前駆体であるアデノシン誘導體 35 を得た。合成したアデノシン誘導體 35 とビニルスルホンアミド体 32 を光延反応によって縮合し目的のプローブ保護体 36 を得た。36 を TFA 条件下で脱保護したところ、目的のプローブと TBS 体との混合物が得られた。そこで、混合物に対して TBAF を用いて TBS 基を脱保護を行い、目的のプローブ 27 の合成を達成した。

本合成法は酸性条件にて脱保護可能な保護基及びシリル系保護基で保護されたアミノ酸を用いることで、他のアミノ酸の側鎖部を含む多様な側鎖部を有するプローブ合成に適用可能である。そのため、L-Val に基質特異性を有する A ドメインに隣接する CP のみならず、他のアミノ酸を担持する CP を標的としたプローブ合成へと展開可能であると言える。



Scheme 2-1. Synthesis of compound 32.



Scheme 2-2. Synthesis of probe 27.



## 【リコンビナント NRPS モジュールを用いた標識化実験】

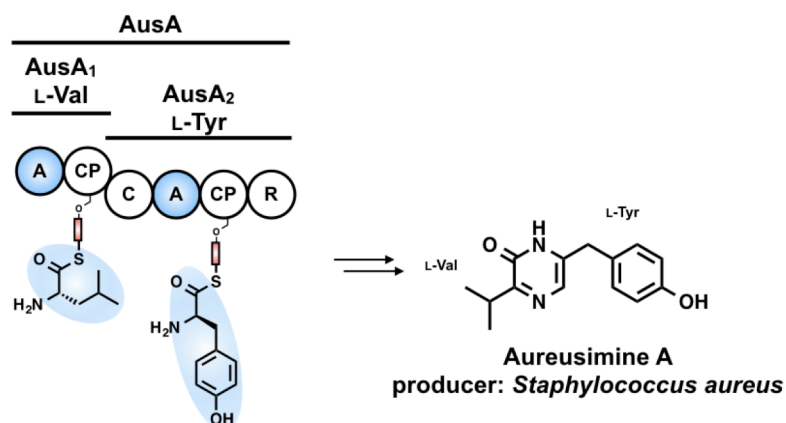
合成した L-Val 型のプローブ (27) の機能評価を行うべく、リコンビナント NRPS モジュールの標識化実験を行った。評価に用いるリコンビナント NRPS モジュールとして *Staphylococcus aureus* が産生する NRP である aureusimine A の生合成酵素を選択した (Figure 2-5)。その一つ目の NRPS モジュール AusA<sub>1</sub> は L-Val を基質として認識する A ドメインを含む。そこで大腸菌によって発現、精製した NRPS モジュール AusA<sub>1</sub> を用いて評価を行うこととした。まず、翻訳後修飾されていない apo-AusA<sub>1</sub> を発現、精製した。次に、apo-AusA<sub>1</sub> から *Bacillus subtilis* 由来 PPTase である Sfp と補酵素 CoA によって holo-AusA<sub>1</sub> を調製した。

はじめに、NRPS モジュールの翻訳後修飾の有無による標識化の変化を検討した (Figure 2-6)。Apo-AusA<sub>1</sub> 及び holo-AusA<sub>1</sub> に対して、それぞれプローブ (27) を緩衝液中 12 時間、25 °C で作用させた。その後、反応液中で Huisgen 環化付加反応条件に付してプローブに TAMRA-N<sub>3</sub> を付加し、SDS-PAGE ゲルでタンパク質を分離し蛍光スキャナでその蛍光強度の観察を行った。その結果、PPant 基を持たない apo-AusA<sub>1</sub> はほとんど標識化されない一方で、PPant 基を持つ holo-AusA<sub>1</sub> は強く蛍光標識化された。また、holo-AusA<sub>1</sub> に対してプローブ処理と同時に NRPS の L-Val を基質とする A ドメインの選択的阻害剤である L-Val-AMS (12) を作用させたところ、その蛍光標識は抑えられた。以上の結果から、プローブ (27) による標識化は A ドメインを介して行われていることが示された。さらに、その標識化には CP の PPant 化が重要であることが明らかとなった。

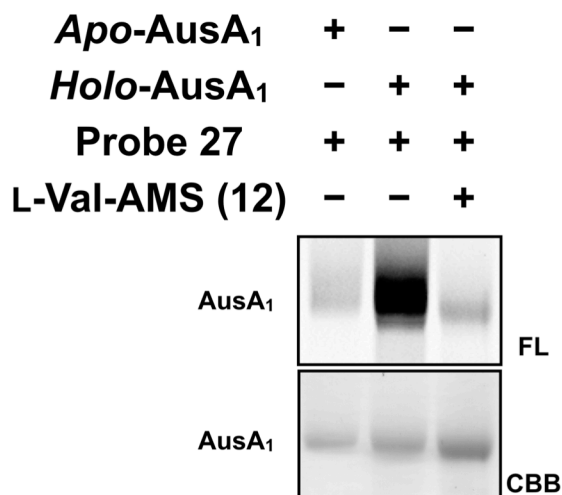
次に、プローブ (27) と holo-AusA<sub>1</sub> を用いて標識化条件の詳細な検討を行った。緩衝液の最適な pH、プローブの処理時間、プローブの濃度の三点を検討した (Figure 2-7)。緩衝液の pH を 6.5 から 8.5 まで、0.5 刻みで調製した緩衝液を用いて先と同様の条件でその標識化を検討した。その結果、酸性から中性条件下 (pH 6.5-7.0) では全く標識化がみられなかった。一方、塩基性条件下では標識化がみられ、高 pH 条件になるにつれ、その標識化強度が強まる蛍光が見られたが、非特異的な標識化による蛍光強度の増加も見られた。プローブの標識化に重要であると考えられる PPant 末端のチオール基の pKa (the thiol pKa value of CoA: 9.83)<sup>49</sup> に依存していると考えられる。したがって、プローブ (27) による標識化の最適条件を pH 8.0 とした。次にプローブ (27) の処理時間を変化させたところ、時間依存的に標識化が進行し、8 から 12 時間で飽和している様子が観察で

きた。また、プローブ濃度をタンパク質 *holo-AusA<sub>1</sub>* 1  $\mu\text{M}$  に対して 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  としたところ、プローブ濃度依存的にその標識化効率が上がった。緩衝液の pH 8.0、プローブ処理時間 12 時間、プローブ濃度が *holo-AusA<sub>1</sub>* 1  $\mu\text{M}$  に対して 100  $\mu\text{M}$  のとき、その標識化効率は  $70 \pm 1.1\%$  であることがわかった (Figure 2-8)。

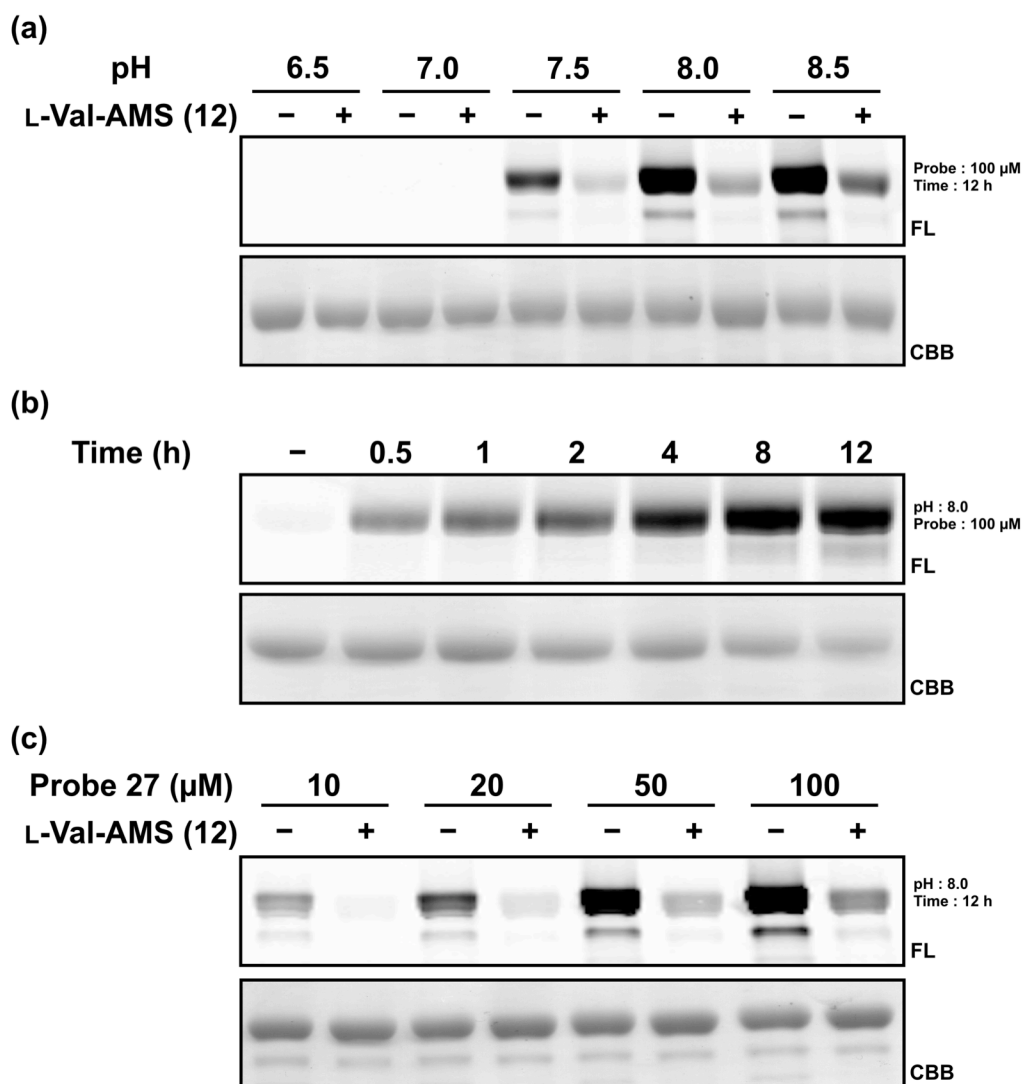
次に、他のリコンビナント NRPS モジュールを用いた A ドメインの基質特異性による標識化の変化について検討した (Figure 2-9)。L-Val 以外のアミノ酸を基質とする A ドメインを含むリコンビナント NRPS モジュールを用いて、その標識化を検討した。リコンビナント NRPS モジュールとして、先の実験で用いた *AusA<sub>1</sub>* に加え、*aureusimine A* の生合成酵素であり L-Tyr を基質とする A ドメインを含むもう一つのモジュール *AusA<sub>2</sub>* と、*tyrocidine* の生合成酵素であり L-Pro を基質とする A ドメインを含む NRPS モジュール *TycB<sub>1</sub>* を選択した。それぞれ大腸菌組換えタンパク質として精製し、*Bacillus subtilis* 由来 PPTase である Sfp と補酵素 CoA によって *holo-AusA<sub>2</sub>* と *holo-TycB<sub>1</sub>* を調製した。それぞれの NRPS モジュール (350 nM) に対して、100  $\mu\text{M}$  の L-Val 型のプローブ (27) を先の検討から見出した最適条件下で作用させた。その結果、いずれの NRPS モジュールの CP も PPant 化をされているが、その標識化に差が見られた。強く標識化された *AusA<sub>1</sub>* に比べ、弱いながら *AusA<sub>2</sub>* でも標識化が見られ、*TycB<sub>1</sub>* は全く標識化されなかった。*AusA<sub>2</sub>* の A ドメインは L-Tyr-AMS (20) の他に L-Val-AMS (12) でも弱く阻害されることが知られている [ $^{app}K_i = 10 \pm 1 (\mu\text{M})$ ]<sup>31</sup>。そのため、プローブ (27) によって *AusA<sub>2</sub>* の標識化が一部進行したことは妥当だと考えられる。一方、L-Pro を基質とする *TycB<sub>1</sub>* の A ドメインは第一章の結果から L-Val を基質としてほぼ認識せず (Figure 1-11)、本実験での結果とよく一致するものである。以上の結果から、プローブ (27) による標識化は隣接する A ドメインの基質認識に依存し標識化が進行することが示唆された。また、この結果からこれまでの知見と同様に、プローブ (27) による CP の標識化は A ドメインを介して選択的に進行していることが強く支持された。



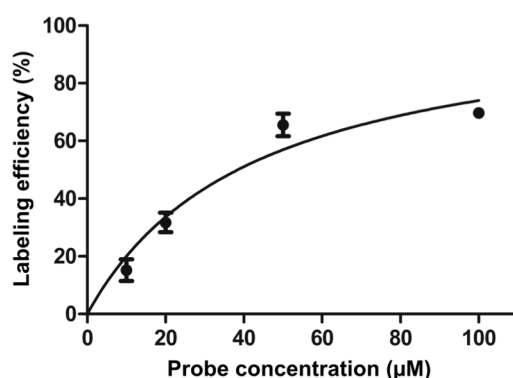
**Figure 2-5.** Biosynthetic pathway of aureusimine A.



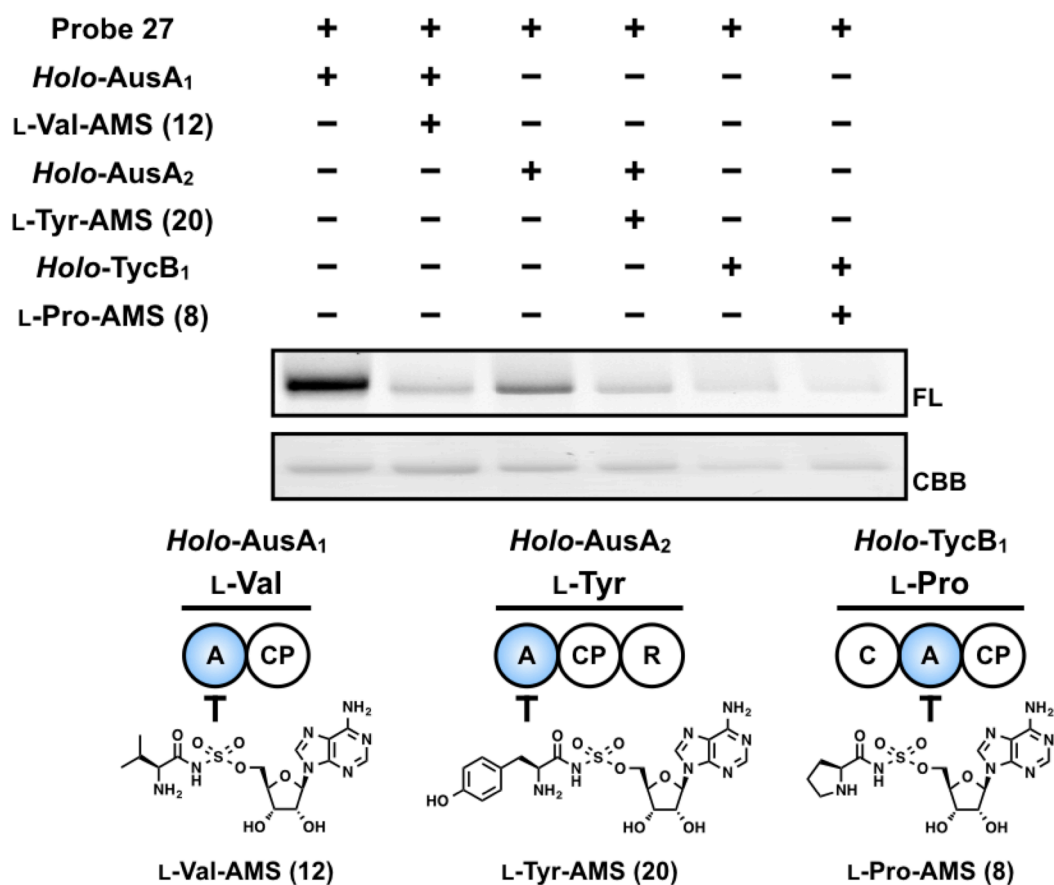
**Figure 2-6.** Labeling of recombinant AusA<sub>1</sub> with probe 27. SDS-PAGE analysis depicting the labeling of 350 nM *apo*- and *holo*-AusA<sub>1</sub> in 20 mM Tris (pH 8.0) for 12 hr at 25 °C in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS (12). Full gel (Figure S2-3a) are provided in the SI (supporting information).



**Figure 2-7.** Investigation of labeling conditions. (a) Determination of an optimal pH for the labeling of *holo-AusA<sub>1</sub>*. *Holo-AusA<sub>1</sub>* (350 nM) was incubated with 100  $\mu$ M probe 27 in 20 mM Tris (pH 6.5-8.5) for 12 h at 25 °C in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS (12). Full gel (Figure S2-3b) are provided in the SI. (b) Time-course study of the labeling of *holo-AusA<sub>1</sub>* with probe 27. SDS-PAGE analysis denoting the labeling of 350 nM *holo-AusA<sub>1</sub>* in 20 mM Tris (pH 8.0) for 0.5-12 h at 25 °C with 100  $\mu$ M probe 27. Full gel (Figure S2-3d) are provided in the SI. (c) Concentration dependence of *in vitro* probe labeling of *holo-AusA<sub>1</sub>*. *Holo-AusA<sub>1</sub>* (1  $\mu$ M) was reacted with 10-100  $\mu$ M probe 27 for 12 h at 25 °C in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS (12). Full gel (Figure S2-2) are provided in the SI.



**Figure 2-8.** Labeling efficiency of recombinant *holo-AusA<sub>1</sub>* by probe **27**. Measured by figure 2-7(c).



**Figure 2-9.** Labeling specificity of probe **27**. *Holo-AusA<sub>1</sub>* (350 nM), *holo-AusA<sub>2</sub>* (350 nM), and *holo-TycB<sub>1</sub>* (350 nM) were treated 100 μM probe **27** in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS (**12**), L-Tyr-AMS (**20**), and L-Pro-AMS (**8**). Full gel (Figure S2-3(e)) are provided in the SI.

## 【内在性 NRPS の CP 標識化実験】

これまでの結果から、プローブ (27) は PPant 末端チオール基を標的として NRPS モジュールを標識化すること、そして、その標識化は A ドメインを介した触媒機構に基づくことが示唆された。そこで、プローブ (27) が複数の翻訳後修飾された CP が存在する内在性 NRPS に対しても A ドメインの厳密な基質特異性を利用して選択的に PPant を検出可能か否か検討した。

本実験の標的 NRPS として微生物由来の界面活性剤である surfactin A の生合成酵素を選択した (Figure 2-10)<sup>50</sup>。Srfactin A は 3 つの NRPS によって生合成されることが知られている。一つ目の SrfA-A (402 kDa) は 1 つの L-Glu、2 つの L-Leu を基質とする A ドメインを含む 3 つのモジュールによって構成されている。二つ目の SrfA-B (401 kDa) は L-Val、L-Asp、L-Leu を基質とする A ドメインを含む 3 つのモジュールによって構成されている。三つ目の SrfA-C (144 kDa) は L-Leu を基質とする A ドメインを含む 1 つのモジュールによって構成されている。生体内で産生された NRPS は PPTase によって速やかに翻訳後修飾される。そのため、surfactin A を産生する微生物の細胞抽出液に対してプローブを作用させることで、SrfA-B に含まれる L-Val を基質とする A ドメインと隣接する CP のみが標識化されることが期待される。

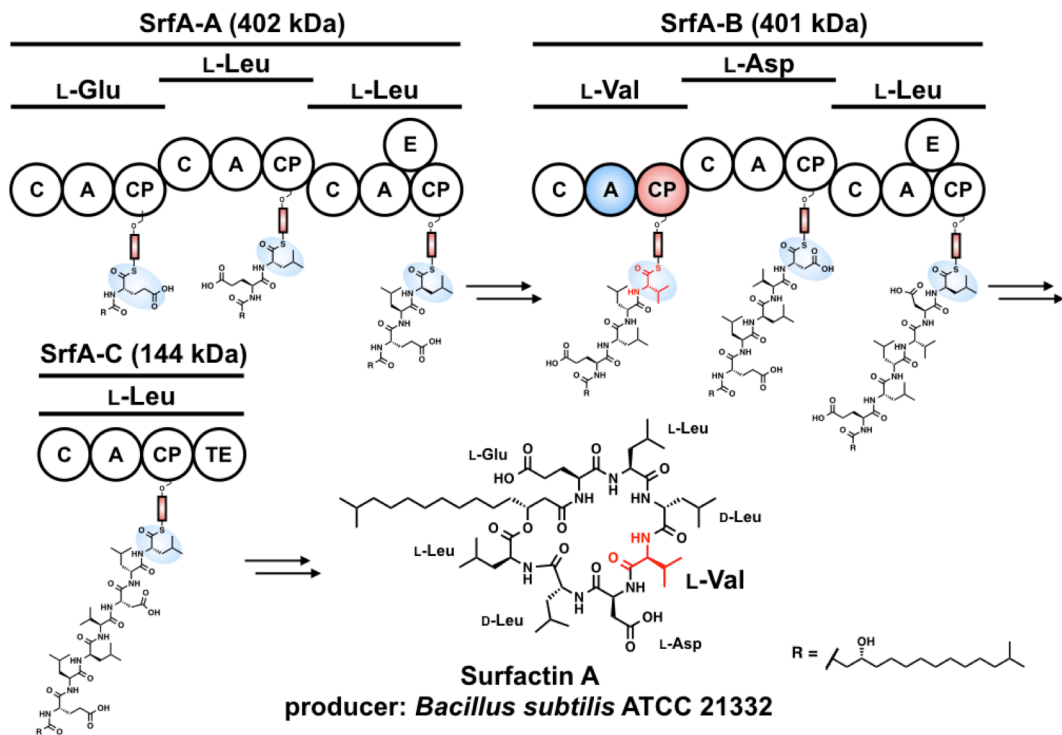
標識化実験にあたり、surfactin A を産生することが知られる *Bacillus subtilis* ATCC 21332 を用いた。まず、SrfA-A、SrfA-B 及び SrfA-C を産生している菌体を得るために培養条件の検討を行った。培地は surfactin A を産生する条件である MSI 培地 (glucose (4%, w/v), 50 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 μM CaCl<sub>2</sub>, 800 μM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM sodium EDTA, 4 mM FeSO<sub>4</sub>) を選択した<sup>51</sup>。そして、培養時間の検討を行った (Figure 2-11)。時間ごとに OD<sub>600</sub> を測定し、その時の菌体を回収した。その菌体の細胞抽出液を作製し、SDS-PAGE で分離後に CBB で菌体内のタンパク質を観察した。その結果、本培養の培地の OD<sub>600</sub> が 1 から 2 の間に、SrfA-A 及び SrfA-B と推測される約 400 kDa のタンパク質のバンドが二本観察された (Figure 2-14 (# and ##))。この二本のバンドを切り出し MS/MS 解析した結果、高分子量側のバンドが SrfA-A (Figure 2-12)、低分子量側のバンドが SrfA-B (Figure 2-13) であった。

*Bacillus subtilis* ATCC 21332 株を培養し SrfA-A、SrfA-B 及び SrfA-C が含まれる菌体を得て、その細胞抽出液に対してプローブ (27) を作用させ、その標識化

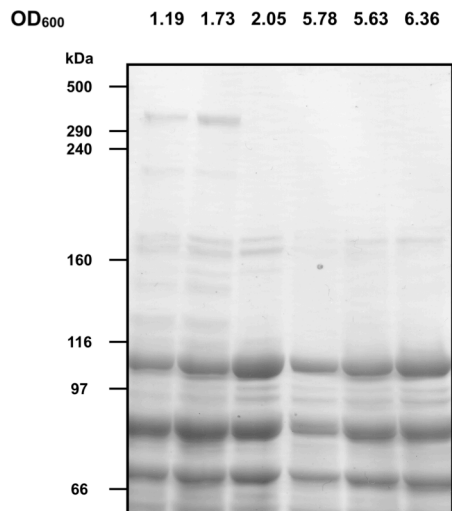
の様子を観察した。まず、標識化の時間依存性を検討した (Figure 2-14)。培養した菌体の細胞抽出液に対してプローブ (27) 及び L-Val-AMS (12) を作用させ、その標識化を検討した。その結果、2 時間からプローブ 27 による SrfA-B の選択的な標識化が観察された。

次に、各種 A ドメイン阻害剤を用いた競合阻害実験を行った (Figure 2-15a)。SrfA-B がもつ A ドメインの阻害剤である L-Val-AMS (12)、L-Asp-AMS (22)、L-Leu-AMS (13) をそれぞれ処理した細胞抽出液に対してプローブ (27) による標識化を行った。その結果、阻害剤非存在下ではプローブ (27) によって SrfA-B が強く蛍光標識された。この SrfA-B の標識化は L-Val-AMS (12) 及び L-Leu-AMS (13) を処理したレーンで消失した。そのため、プローブ (27) の標識化は L-Asp を基質とする A ドメインを介していないと考えられた。プローブ (27) による SrfA-B の標識化は L-Val-AMS (12) 及び L-Leu-AMS (13) で阻害されたため、L-Val 及び L-Leu を基質とする A ドメインを介して進行していると考えられた。このとき、L-Leu を基質とする A ドメインを介して標識化が進行しているのならば、SrfA-A 及び SrfA-C の標識化が進行するはずである。しかし、SrfA-A 及び SrfA-C の標識化は全く見られない。以上のことから、プローブ (27) による SrfA-B の標識化は L-Val を基質とする A ドメインを介して進行していると考えられた。

さらなる検証を行うため、より低濃度の阻害剤を用いた競合阻害実験を行った。その結果、L-Leu-AMS (13) ではプローブ (27) による SrfA-B の標識化の阻害が見られず、L-Val-AMS (12) を処理したレーンでのみプローブ (27) による標識化の阻害が見られた (Figure 2-15b)。以上の結果から、プローブ (27) は L-Val を基質とする A ドメインを介して SrfA-B を標識していることが明らかとなった。L-Leu-AMS (13) は疎水性アミノ酸であり L-Val-AMS (12) と類似した構造を有する。そのため、本実験では L-Leu-AMS (13) が L-Leu を基質とする A ドメインのみならず、L-Val を基質とする A ドメインの活性部位とも親和性を示し、阻害したと考えられた (Figure 2-16)。



**Figure 2-10.** Biosynthetic pathway of surfactin A.



**Figure 2-11.** Investigation of the expression patterns of surfactin biosynthetic enzymes.



SrfAA 69%  
module1 (2-1040, 749/1039) 71.8%  
module2 (1058-2081, 741/1024) 72.8%  
module3 (2097-3425, 857/1329) 64.5%

```

1 MEITFYPLTD AQRRIWYTEK FYPHTSISNL AGIGKLVSD AIDYVLVEQA
51 IQEFIRRNDA MRLRLRLDEN GEPVQYISEY RPYDIKHTDT TEDPNAIEFI
101 SQWSREETKK PLYLYDCDLF RFLFTIKEN EVWFYANVHH VISDGISMNI
151 LGNAIMHIYL ELASGETKE GISHSFIDHV LSEQEYAQSK RFEKDKAFWN
201 KFESVPELV SLKRNASAGG SLDAERFSKD VPEALHQQIL SFCEANKVSV
251 LSVFQSLAA YLYRVSGQND VVTGTFMGNR TNAKEKQMLG MfvSTVPLRT
301 NIDGGQAFSE FVKDRMKDLM KTLRHQKYPY NLLINDLRET KSSLTkLFTV
351 SLEYQVMWQ KEEDLAFLTE PIFSGSGLND VSIHVKDRWD TGKLTIDFDY
401 RTDLFSREEI NMICERMITM LENALTHPEH TIDELTLISD AEKEKLLARA
451 GKSVSVYRKD MTIPELFQEK AELLSDHPAV VFEDRTLSTYR TLHEQSARIA
501 NVLKQKGVGP DSPVAVLIER SERMITAIMG ILKAGGAYVP IDPGFPAERI
551 QYILEDCCAD FILTESKVAE PEADAELIDL DQAEIEGAE SLNADVNARN
601 LAYIIYTSGT TGRPKGVMIE HRQVHHLVES LQQTIVQSGS QTLRMALLAP
651 FHFDAVSKQI FASLLGQTL YIVPKKTVTN GAALTAYYRK NSIEATDGTPT
701 AHLQMLAAAG DFEGKLKHM LIGGEGSSV VADKLLKLFK EAGTAPRLTN
751 VYGPTECTVD ASVHPVIPEN AVQSAYVPIG KALGNRLYI LDQGRIQPE
801 GVAGELYIAG DGVGRGYLHL PELTEEKFLQ DPFVPGDRMY RTGDVVRWLP
851 DGTIEYLGRE DDQVKVRYR IELGEIAVI QOAPDVAKAV VLARPDQGN
901 LEVCAVYVQK PGSEFAPAGL REHAARQLPD YMVPAVFTEV TEIPLTPSGK
951 VDRRKLFALE VKAVSGTAYT APRNETEKAI AAIWQDVLNV EKAGIFDNFF
1001 ETGGHSLKAM TLLTKIHKET GIEIPLQFLF EHPITALAE EADHRESKAF
1051 AVIEPAEKQE HYPLSLAQOR TYIVSQFEDA GVGYNMPAAA ILEGPLDIQK
1101 LERAFQGLIR RHESLRTSFV LENSTPRQKI HDSVDNIEM IERGRSDEA
1151 IMASFVTRFD LAKAPLFRIG LLGLEENRHM LLFDMHHLIS DGVSIGIMLE
1201 ELARIYKGEQ LPDLRLQYKD YAVWQSRQAA EGYKQDQAYW KEVFAGELPV
1251 LQLLSDYPRP PVQSFEGDRV SIKLDAGVKD RLNRLEAQNG ATLYMVMLSA
1301 YTTLLSKYTG QDDIIVGTPS AGRNHSDETEG IIGMFVNTLA IRSEVKQNET
1351 FTQLISVRK RVLDAFSHQD YPFEWLVEDL NIPRDVSRHP LFDTMFSLQN
1401 ATEGIPAVGD LLSLVQETNF KIAKFDLTVO ARETDEGIEI DVDYSTKLFK
1451 QSTADRLTH FARLLEDAEA DPEKPISEYK LLEEEEAASQ IQQFNPGRTP
1501 YPKDKTIVQL FEEQAANTPD HTALQYEGES LTYRELNERA NRLARGILSL
1551 GAGEGRTAAV LCERSMDMIV SILAVLKSGS AYVPIDPEHP IQRMQHFFRD
1601 SGAKVLLTQR KLKALAEAE FKGVIVLADE EESHADARN LALPLDSAAM
1651 ANLTYTSQTT GTPKGNIVTH ANILRTVKET NYLSITEQDT ILGLSNVYFD
1701 AFMFDMFGSL LNGAKLVLP KETVLDMARL SRVIERENIS ILMITTALFH
1751 LLVDLNPACL STLRKIMFGG ERASVEHVRK ALQTVGKGL LHMVGPSEST
1801 VFATYHPVDE LEEHTLSVPI GKPVSNTEVY ILDRTGHVQP AGIAGELCVS
1851 GEGLVKGYIN RPELTEEFV PHPFTSGERM YKTGDARWL PNGDIEFIGR
1901 IDHQVKIRGQ RIELGEIEHQ LQTHDRVQES VVLAVDQAG DKLLCAYYVG
1951 EGDISSQEMR EHAAKDLPAY MPAVFIQMD ELPLTNGKI DRRALPIPA
2001 NVSRQVSYVA PRNGTEQKVA DIWAQVLQAE QVGAYDHFDP IGGHSLAGMK
2051 MLALVHQELG VELSLKDLFQ SPTVEGLAQV IASAEKGTAA SISPAEKQDT
2101 YPVSSPQKRM YVLQLEDAQ TSYNMPAVLR LTGELDVERL NSVMQQLMQR
2151 HEALRTTPEI KDGETVQRIW EEAECEIAYF EAPEEETERI VSEFIKPFKI
2201 DQLPLFRIGL IKHSDTEHVL LFDMHIIISD GASVGVLEE LSKLYDGETL
2251 EPLRIQYKDY AVWQQFIQS ELYKKQEEHW LKELDGELPV LTLPTDYSRP
2301 AVQTFEGDRI AFSLEAGKAD ALRRLAKETD STLYMVLAS YSAFLSKISG
2351 QDDIIVGSPV AGRSQADVSR VIGMFVNTLA LRTYPKGETT FADYLVNEVKE
2401 TALSAFDAQD YPLEDLIGNV QVORDTSRNP LFDVAFSMQN ANIKDLTMKG
2451 IQLEPHPFER KTAKFDLTLT ADETGGGLTF VLEYNTALFK QETIERWKQY
2501 WMELLDVAVTG NPNQPLSSLS LVTETEKQAL LEAWKPKALP VPTDKTVHQL
2551 FEETAQRHKD RPAVYNGQS WTYGELNAKA NRLARILMDC GISPDRVGV
2601 LTKPSLEMSA AVLGVLKAGA AFVPIDPDYP DQRIEYILQD SGAKLLKQE
2651 GISVPDSYTG DVILLDGSRT ILSLPLDEND EENPETAVTA ENLAYMIYTS
2701 GTTGQPKGVM VEHHALVNLC FWHHDAFSMT AEDRSKYAG FGFDAIWMEM
2751 FPTWTIGAEI HVIEEAIRLD IVRLNDYFET NGVTITFLPT QLAEQFMELE
2801 NTSRLVLLTG GDKLRRAVK PYTLVNNYGP TENTVVATSA EIHPEEGSL
2851 IGRAIANTRV YILGEGNQVQ PEGVAGELCV AGRGLARGYL NREDETAKRF
2901 VADPFVPGER MYRTGDLVKW TGGGIEYIGR IDQQVKVRYG RIELSEIEVQ
2951 LAQLSEVQDA AVTAVKDKGG NTAIAAYVTP ESADIEALKS ALKETLPDYM
3001 IPAFWVTLNE LPVTANGKVD RKALPEPDIE AGSGEYKAPT TDMEELLAGI
3051 WQDVLGMSEV GVTDNFFSLG GDSIKGIQMA SRLNQHGWLK EMKDLFQHP
3101 IEELTYQYVER AEGKQADQGP VEVEVILTP IQRWFFEKNFT NKHHWNQVSM
3151 LHAKKGFDPPE RVEKTLQALI EHHDALRMVY REGQEDVIQY NRGLEAASAQ
3201 LEVIQIEGQA ADYEDRIERE AERLQSSIDL QEGGLLKAGL FOAEDGDHLL
3251 LAIHHLVVDG VSWRILLED F AAVYTQLEQG NEPVLPQKTH SFAEYERLQ
3301 DFANSKAFK EKEYWRQLEE QAVAAKLPK RESGDQRMKH TKTIEFSLTA
3351 EETEQLTKV HEAYHTEMND ILLTAFGLAM KEWTGQDRVS VHLEGHGREE
3401 IIEDLTISR T VGFWTSMPYM VLDMKHADDL GYQLKQMKED IRHVPKGVG
3451 YGILRYLTAP EHKEDVAFSI QPDVSNFYLG QFDEMSDAGL FTRSELPSGQ
3501 SLSPETEKPN ALDVVGYIEN GKLTMSLAYH SLEFHEKTVQ TFSDSFKAHL
3551 LRIIEHCLSQ DGETELTPSDL GDDDLTLEDEL DKLMEIF

```

Figure 2-12. MASCOT report for MS/MS analysis of excised gel SrfA-A (#) bands from *B. subtilis* ATCC 21332 proteome.

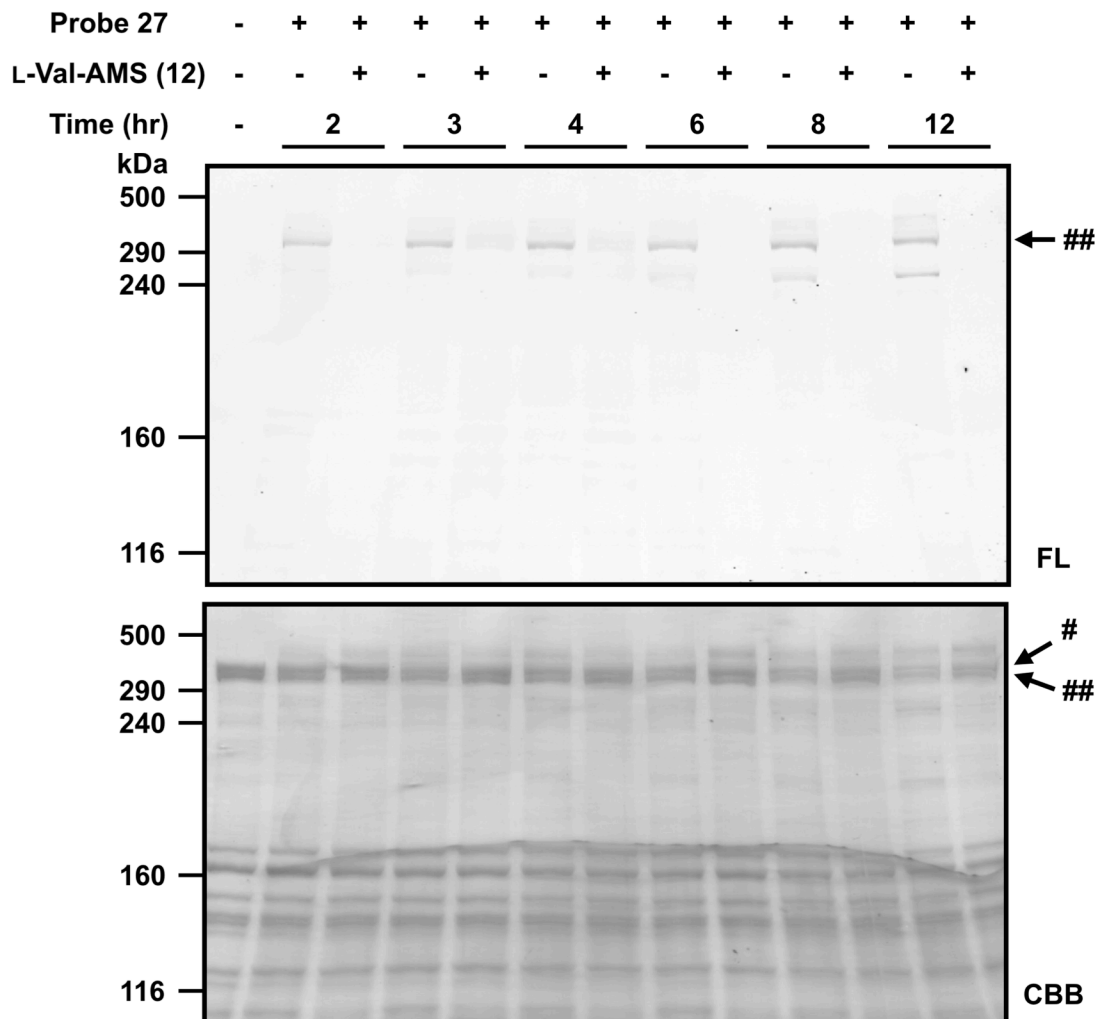
SrfAB 59%  
 module4 (6-1035, 515/1030) 50.0%  
 module5 (1055-2075, 684/1021) 67.0%  
 module6 (2093-3421, 739/1329) 55.6%

```

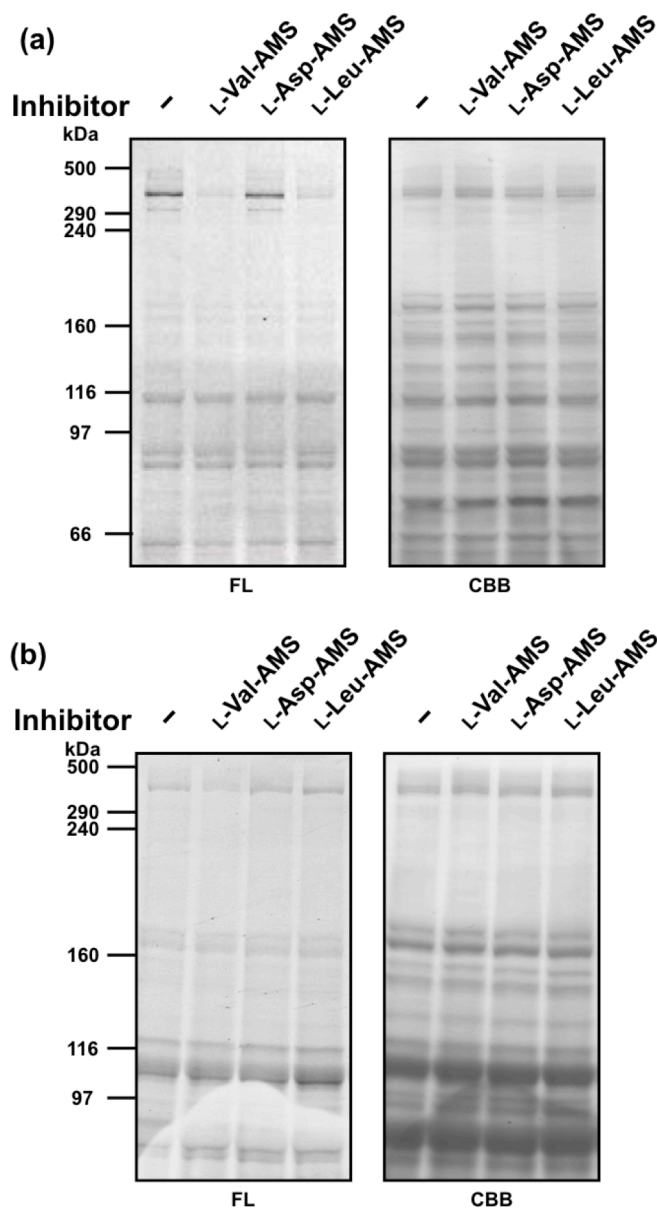
1 MSKKSIIQKVY ALTPMQEGML YHAMLDPHSS SYFTQLELGI HGAFDLEIFE
51 KSVNELIRSY DILRTVVFHQ QLQKPRQVVL AERKTKVHYE DISHADENRQ
101 KEHIERYKQD VQRQGFNLAQ DILFKVAVFR LAADQLYLWV SNHHIMMDGW
151 SMGVLMKSLF QNYEALRAGR TPANGQKPY SDYIKWLGKQ DNEEAESYWS
201 ERLAGFEQPS VLPGRLLPVKK DEYVNKEYSF TWDETLVARI QQTANLHQVT
251 GPNLFQAVWG IVLSKYNFTD DVIFGTUVSG RPSEINGIET MAGLFIINTIP
301 VRVKVERDAA FADIFTAVQQ HAVEAERYDY VPLYEIQKRS ALDGNLLNHL
351 VAFENYPLDQ ELENGSMEDR LGFSIKVESA FEQTSFDFNL IVYPGKTWTV
401 KIKYNGAAFDF SAFIERTAEH LTRMEEAAVD QPAAFVREYG LVGDEEQROI
451 VEVFNSTKAE LPEGMAVHQV FEEQAKRTPA STAVVYEGTK LTYRELNAAA
501 NRLARKLVEH GLQKGETAAI MNDRSVETVV GMLAVLKAGA AYVPLDPAIP
551 GDRLRFMAED SSVRMVLIGN SYTGQAHLQV VPVLTLDIGF EESEADNLN
601 LPSAPSDLAY IMYTSGSTGK PKGVMIEHKS ILRLVKNAGY VPVTEEDRMA
651 QTGAVSFDAG TFEVFGALLN GAAALYPVKKE TLLDAKQFAA FLREQSITTM
701 WLTSPLFNQL AAKDAGMFGT LRHLIIGGDA LVPHIVSKVK QASPSLSLWN
751 GYGPTENTTF STSFLIDREY GGSIPIGKPI GNSTAYIMDE QQCLQPIGAP
801 GELCVGGIGV ARGVYNLPEL TEKQFLEDDP RPGERIYRTG DLARWLDPGN
851 IEPLGRIDNQ VKVRGFRIEL GEIETKLNMA EHVTEAAVII RKNKADENEI
901 CAYFTADREV AVSELRKTL SLSLPMVMPA HLIQMDSLPL TPNKGINKKE
951 LPAPQSEAVQ PEYAAPKTES EKKLAEIWEQ ILGVKAGVTD NFFMIGGHSL
1001 KAMMMTAKIQ EHPHKEVPIK VLFEKPTIQE LALYLEENES KEEQTFEPIR
1051 QASYQOHYPV SPAQRMYIIL NQLGQANTSY NVPVALLLEG EVDKDRLENA
1101 IQQLINRHEI LRTSFDMDIG EVVQTVHKNI SFQLEAAKGR EEDAEIIEKA
1151 FVQPFELNRA PLVRSKLVQL EKRHLLIID MHHIITDGSS TGILIGDLAK
1201 IYQADLELP QIHYKDYAVW HKEQTNQYKD EEWLDVFKG ELPILDLPAD
1251 FERPAERSFA GERVMFGLDK QITAIKSLM AETDTMYMF LLAAFNVLLS
1301 KYASQDDIIV GSPTAGRTHP DLQGVPGMFV NTVALRTAPA GDKTFAQFLE
1351 EVRTASLQAF EHQSYPLEEL IEKPLPLTRDT SRSPLFSVMF NMQNMIEPSL
1401 RLGDKLISSY SMLHHVAKFD LSLEAVEREE DIGLSFDYAT ALFKDETIRR
1451 WSRHFVNIK AAAANPNVRL SDVDLLSSAE TAALEERHM TQITEATFAA
1501 LFEKQAQQTP DHSAVKAGGN LLYRELDEQ ANQLAHLRA QGAGNEDIVA
1551 IVMDRSAEVM VSILGVMKAG AAFLPIDPDT PEERIRYSLE DSGAKFAVNV
1601 ERNMTAIGQY EGIIVSLDDG KWRNESKERP SSISSGRNLA YVIYTSGTTG
1651 KPKGVQIEHR NLTNYSVWFS EEAGLTENDK TVLLSSYAFD LGYTSMPFVL
1701 LGGGELHIVQ KETYTAPDEI AHYIKEHGIT YIKLTPSLFH TIVNTASFAK
1751 DANFESLRLI VLGGEKIIPD DVIAFRKMYG HTEFINHYGP TEATIGAIAG
1801 RVDLYEPDAF AKRPTIGRPI ANAGALVNE ALKLVPPGAS GQLYITGQGL
1851 ARGYLNRPQL TAERFVENPY SPGSLMYKTG DVVRRLSDDGT LAFIGRADDQ
1901 VKIRGYRIEP KEIETVMSLS SGIQEAUVLA VSEGGQELC AYTSDDQIE
1951 KAELRYQLSL TLP SHMIPAF FVQVDAIPLT ANGKTRDNL PKPNAQSGG
2001 KALAAPETAL EESLCRIWQK TLGIEAIGID DNFFDLGGHS LKGMMLIANI
2051 QAELEKSVPL KALFEQPTVR QLAAYMEASA VSGGHQVLKP ADKQDMYPLS
2101 SAQRMYVVLN QLDRQTIISYN MPSVLLMEGE LDISRLRDSL NQLVNRHESL
2151 RTSFMEANGE PVQRIIEKAE VDLHVFEAKE DEADQKIKEF IRPFDLNDAP
2201 LIRAALLRIE AKKHLLLDDM HHIADGVSR GIFVKELALL YRGEQLPEPT
2251 LHYKDFAVWQ NEAEQKERMK EHEAYWMSVL SGELPELDLP LDYARPPVQS
2301 FKGDITIRFRT GSETAKAVEK LLAETGTTLH MVLHAVFHFV LSKISGQREDI
2351 VIGSVTAGRT NADVQDMPGM FVNTLALRME AKEQQTFAEL LELAKQTNLS
2401 ALEHQEYFPE DLVNQLDLPD DMSRNPLFNV MVTTENPDKE QLTQLNLSIS
2451 PYEAHQGTSK FDLTLGGFTD ENGIGLQLEY ATDLFAKETA EKWSEYVLR
2501 LKAVADNPQ PLSSLLLVTE TEKQALLEAW KGKALPVPTD KTVHQLFEET
2551 VQRHKDRPAV TYNGQSWTYG ELNAKANRLA RILMDCGISP DDRVGVLTKP
2601 SLEMSAAVLG VLKAGAAFPV IDPDYDPQRI EYILQDSGAK LLLKQEGISV
2651 PDSYTGDIVL LDGSRITLISL PLDENDEGNP ETAVTAENLA YMIYTSGTTG
2701 QPKGVMVEHH ALVNLCFVHH DAFSMTAEDR SAKYAGFGFD ASIWEMFPTW
2751 TIGAELHVID EAIRLDIVRL NDYFETNGVT ITFLPTQLAE QFMELENTSL
2801 RVLITGGDKL KRAVKKPYTL VNNYGPTEENT VVATSAEIHP EEGSLSIGRA
2851 IANTRVYILG EGNQVQPEGV AGEKCVAGRG LARGYLNRED ETAKRFVADP
2901 FVPGERMYRT GDLVKWVNGG IEYIGRIDQQ VKVRGYRIEL SEIEVQLAQL
2951 SEVQDAAVTA VKDKGGNTAI AAYVTPETAD IEALKSTLKE TLPDYMIPAF
3001 WVTNLNLPVT ANGKVDKAL PEPDIEAGSG EYKAPTDM ELLAGIWDQV
3051 LGMSEVGVTD NFFSLGGDSI KGIQMASRLN QHGKLEMKD LFPHTIEEL
3101 TQYVERAEGK QADQGPVEGE VILTPIQRWF FEKNFTNKH HNNQSVMLHAK
3151 KGFDPERVEK TLQALIEHHD ALRMVYREEN GDIVQVYKPI GESKVSFEIV
3201 DLYGSDEEML RSQIKLLANK LQSSLDLRNG PLLKAEQYRT EAGDHLLIAV
3251 HHLVVVDGVSF RILLEDFAAG YMQAEKEESL VFPQKTNMSP DWAEELAASF
3301 QSAHLLQAE YWSQIAAEQV SPLPKDCETE QRIVKDTSSV LCELTAEDTK
3351 HLLTDVHQPY GTEINDILLS ALGLTMKEWT KGAKIGINLE GHGREDIIPN
3401 VNISRVTGWTF TAQYPPVLDI SDADASAVIK TVKENLRRIP DKGVGYGILR
3451 YFTETAETRG FTPEISFNLY QQDFSEVKT DFEPSAFDMG RQVSGESEAL
3501 YALSFSGMIR NGRFVLSVSY NEKEFERATV EQMERFKEN LMLLRHCTE
3551 KEDKEFTPSD FSAEDLEMD MGDIFDML E NLK

```

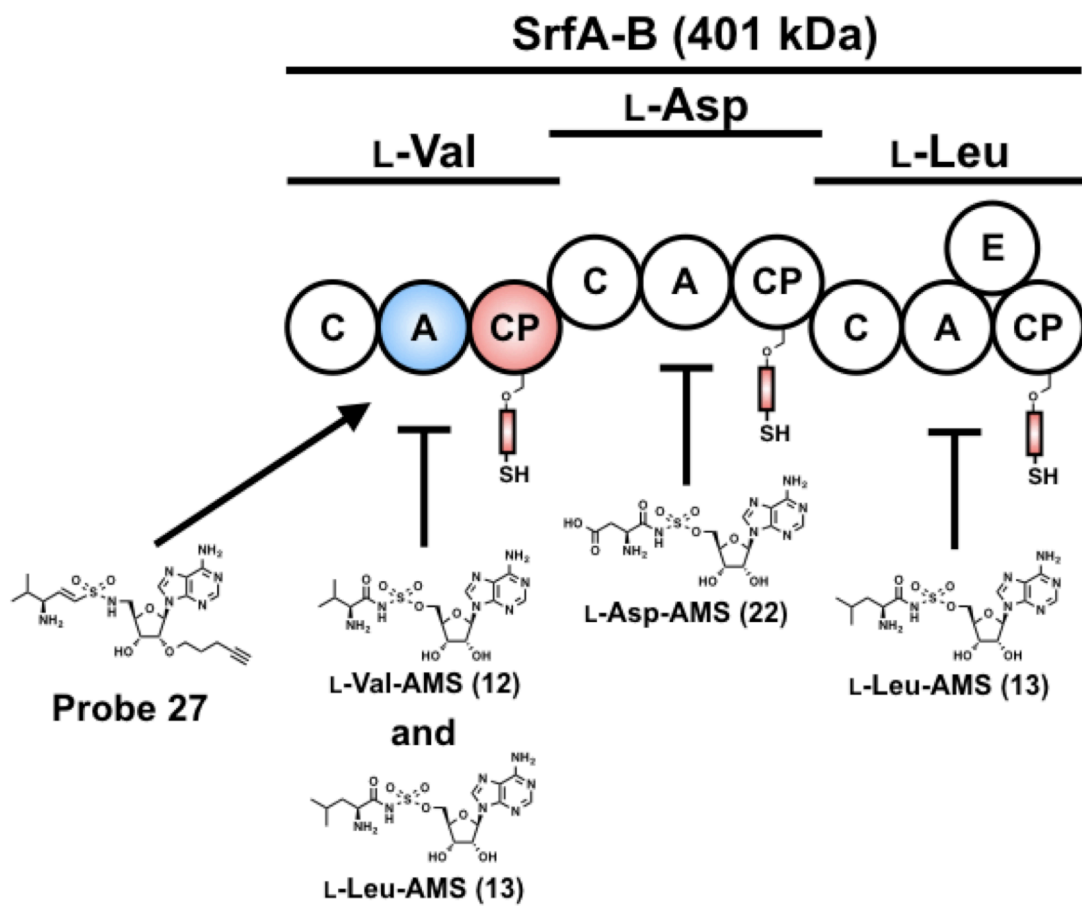
**Figure 2-13.** MASCOT report for MS/MS analysis of excised gel SrfA-B (##) bands from *B. subtilis* ATCC 21332 proteome.



**Figure 2-14.** Labeling of endogenous SrfA-B in a *B. subtilis* ATCC 21332 proteome by probe 27. The *B. subtilis* ATCC 21332 proteome (2.0 mg/mL) was reacted with 100  $\mu$ M probe 27 in 20 mM Tris (pH 8.0) for 2-12 h at 25  $^{\circ}$ C in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS (12). LC/MS-MS analysis identified the isolated protein bands (# and ##) as an SrfA-A and SrfA-B, respectively. Full gel (Figure S2-4a) are provided in the SI.



**Figure 2-15.** Investigation of selective labeling of the CP-domain of SrfA-B using a combination of probe **27** and inhibitors L-Val-AMS (**12**), L-Asp-AMS (**22**) and L-Leu-AMS (**13**). (a) The *Bacillus subtilis* ATCC 21332 proteome (2.0 mg/mL) was individually preincubated with inhibitors L-Val-AMS (**12**), L-Asp-AMS (**22**) and L-Leu-AMS (**13**) (10  $\mu$ M) and reacted with 100  $\mu$ M probe **27** for 2 h at 25 °C. Full gel (Figure S2-4b) are provided in the SI. (b) The *Bacillus subtilis* ATCC 21332 proteome (2.0 mg/mL) was individually preincubated with inhibitors L-Val-AMS (**12**), L-Asp-AMS (**22**) and L-Leu-AMS (**13**) (5  $\mu$ M) and reacted with 100  $\mu$ M probe **27** for 2 h at 25 °C. Full gel (Figure S2-4c) are provided in the SI.



**Figure 2-16.** Schematic summary of the labeling of SrfA-B protein.

## 【第二章の小括】

本章では、NRPS の CP への翻訳後修飾を標的とした分子ツールの開発を行った。NRPS の A ドメインで合成される高反応性中間体であるアミノアシル-AMP を模倣した L-Val 型プローブ (27) を設計し合成を行った。合成したプローブ (27) を用いたリコンビナント及び内在性 NRPS モジュールに対する標識化実験からプローブの機能評価を行った。その結果、プローブ (27) は NRPS の CP 上の PPant を選択的に検出できることが明らかとなった。また、その標識化は CP と隣接する A ドメインの基質特異性に依存していることが確認された。例えば、本研究で合成した L-Val の側鎖部を有するプローブ (27) では L-Val を基質とする A ドメインの活性部位に認識される。その後、隣接する CP の PPant と共有結合を形成することで標的分子の選択的な検出が可能となる。また、本研究で行ったプローブの合成法は他のアミノ酸側鎖部を有するプローブの合成にも適用可能である。そのため、種々のアミノ酸側鎖部を有するプローブを合成し活用することで、NRPS に含まれる複数の CP を個別に検出可能となる。

本研究で開発したプローブは、微生物が産生した内在性 NRPS に対しても適用可能な新たな CP の翻訳後修飾を標的とした分子ツールである。系中に複数存在する翻訳後修飾された CP の中から A ドメインの厳密な基質特異性を利用することで高選択的に CP を標識可能である。本章で開発した CP の選択的標識化プローブを用いることで微生物の内在性 NRPS に対する翻訳後修飾を直接的に検出することが可能となり、生体内における翻訳後修飾の制御機構の解明や PPTase を標的とした創薬基盤の構築につながることを期待される。

## 結論

本研究では内在性 NRPS に適用可能な NRPS 機能解析を目的に、合成小分子化合物群を用いた内在性 NRPS に対する網羅的機能解析技術の開発を行った。

第一章では競合的 ABPP による NRPS の A ドメインの網羅的な基質特異性の解析法の開発を行った。種々のアミノ酸に対して基質特異性を有する A ドメインの選択的阻害剤であるアミノアシル-AMS ライブラリーを構築した。当研究室で開発された A ドメインに対する活性部位指向型プローブとアミノアシル-AMS ライブラリーを組み合わせた競合的 ABPP により A ドメインの基質特異性解析が可能であることを明らかにした。本法は簡便に内在性 NRPS の様々な A ドメインを解析することが可能であり、複数の A ドメインが存在しても各 A ドメインについて個別に解析可能である。また、本法は一度に様々な基質に対する解析を可能とした。

第二章では内在性 NRPS に対する翻訳後修飾の解析を可能とする分子プローブの開発を行った。NRPS の基質であるアミノアシル-AMP を模倣し、適切な位置にマイケルアクセプターを導入したリガンドをもつ、ビニルスルホンアミドアデノシン型プローブの設計及び合成を行った。このプローブを用いることで、複数の CP が存在する内在性 NRPS から隣接する A ドメインの厳密な基質特異性を利用し特定の CP を標識可能であることを明らかにした。これまで、NRPS に対する翻訳後修飾の検出には不安定なチオエステル結合による特異性が低いことや生体内に複数存在する PPant 化 CP を個別に標識化できない、生体内での翻訳後修飾の様子を直接的に解析できないといった問題点があった。本法は微生物の生体内で起こっている NRPS の翻訳後修飾の制御機構の理解への大きな一歩であると考えている。リガンド部のアミノ酸を入れ替えることにより、複数の NRPS に対する生体内での翻訳後修飾による機能制御の解明研究への適用が期待される。

本研究で開発した二つの内在性 NRPS で適用可能な機能解析法によって、より一層、NRPS の酵素反応の制御機構が明らかとなることが期待される。内在性 NRPS を直接用いた A ドメインの網羅的機能解析が可能となったことで、新規 NRPS の機能解析に加えて、NRPS を用いたペプチド性天然化合物の合成を目的とした改変 A ドメインの簡便な機能解析を可能とする技術である。また、内在性 NRPS の CP に対する翻訳後修飾の検出を可能としたことによって、生体内に

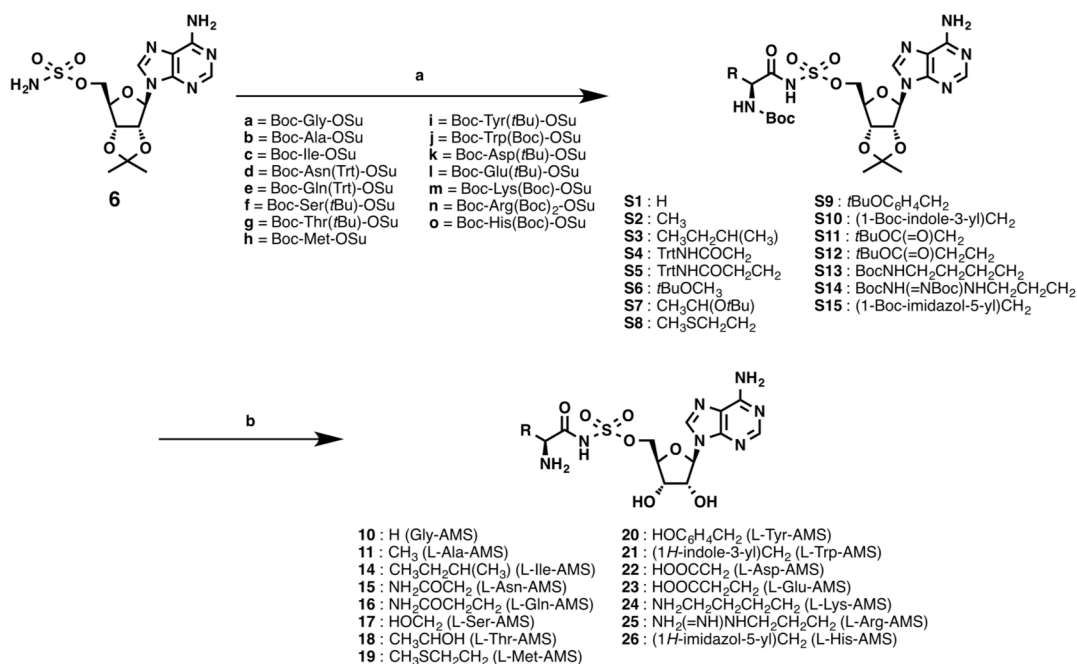
における PPTase の機能解析やそれを創薬ターゲットとしたスクリーニング系の構築による新規医薬品開発を支援するものとなることを期待している。



# 実験項 (Supporting Information, SI)

## 第一章

### Chemical Synthetic Procedures



#### Scheme S1-1. Synthetic route to sulfamoyloxy-linked aminoacyl-AMP analogues.

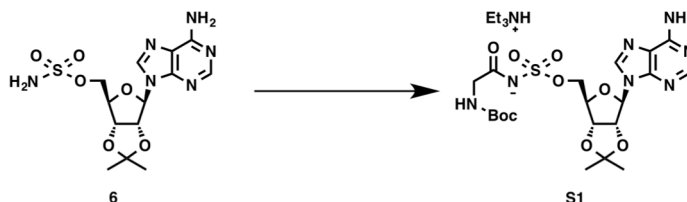
*Reagents and conditions:* [a] *N*-hydroxysuccinimide esters **a-o**, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt: 92% (**S1**); 53% (**S2**); 90% (**S3**); 88% (**S4**); 77% (**S5**); 65% (**S6**); 63% (**S7**); 75% (**S8**); 98% (**S9**); 57% (**S10**); 66% (**S11**); 76% (**S12**); 98% (**S13**); 78% (**S14**); 59% (**S15**); [b] 80% aqueous TFA or a mixture of 90:5:5 (v/v) of TFA, H<sub>2</sub>O, and TIS, rt: 52% (**10**); 77% (**11**); 70% (**14**); 70% (**15**); 40% (**16**); 23% (**17**); 49% (**18**); 57% (**19**); 74% (**20**); 90% (**21**); 83% (**22**); 98% (**23**); 61% (**24**); 70% (**25**); 74% (**26**).

**General Synthetic Methods:** All commercial reagents were used as provided unless otherwise indicated. 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6**<sup>52</sup> (Schemes S1) is known compound. This compound was prepared according to published literature procedures. All reactions were carried out under an atmosphere of nitrogen in dry solvents with oven-dried glassware and constant magnetic stirring unless otherwise

noted. High performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a Prominence CBM-20A (Shimadzu) system equipped with a Prominence SPD-20A UV/VIS detector (Shimadzu).  $^1\text{H-NMR}$  spectra were recorded at 500 MHz.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra were recorded at 125 MHz on JEOL NMR spectrometers and standardized to the NMR solvent signal as reported by Gottlieb.<sup>53</sup> Multiplicities are given as s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, ddd = doublet of triplets, br = broad signal, m = multiplet using integration and coupling constant in Hertz. TLC analysis was performed using Silica Gel 60 F254 plates (Merck) and visualization was accomplished with ultraviolet light ( $\lambda = 254$  nm) and/or the appropriate stain [phosphomolybdic acid, iodine, ninhydrin, and potassium permanganate]. Silica gel chromatography was carried out with SiliaFlash F60 230-400 mesh (Silicycle), according to the method of Still.<sup>54</sup> Mass spectral data were obtained using a LCMS-IT-TOF mass spectrometer (Shimadzu).

### Chemical Synthesis of Gly-AMS 10

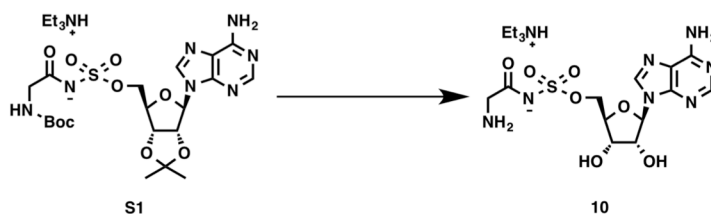
#### 5'-*O*-[*N*-(*N*-Boc-glycyl)sulfamoyl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S1**)



Boc-Gly-OSu (53 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ ) to afford compound **S1** as a white solid (96 mg, 92%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.39 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.35 (br, 2H), 6.34 (t,  $J = 5.7$  Hz), 6.16 (d,  $J = 2.9$  Hz), 5.36 (dd,  $J = 6.3, 2.9$  Hz, 1H), 5.01 (dd,  $J = 5.7, 2.3$  Hz, 1H), 4.39–4.36 (m, 1H), 3.99 (dddd,  $J = 22.9, 22.9, 22.9, 5.2$  Hz, 2H), 3.40 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H), 2.88 (q,  $J = 7.4$  Hz, 12H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_2$ ), 1.54 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.32 (s, 3H), 1.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 18H,  $\text{Et}_3\text{N-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  173.8, 156.1, 155.5, 152.8, 149.0, 139.5, 118.8, 113.1, 89.2, 83.8, 83.4, 81.6, 79.2, 77.5, 67.0, 45.6,

28.2, 27.0, 25.2, 9.5. HRMS (ESI+):  $[M+H]^+$  calcd for  $C_{20}H_{29}N_7O_9S$ , 544.1820; found, 544.1792.

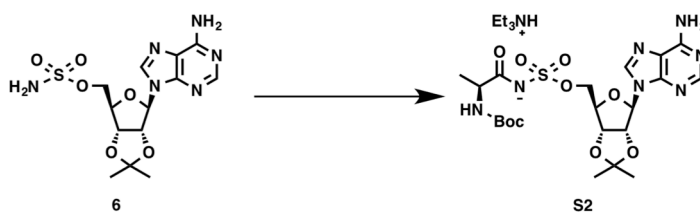
### 5'-O-(*N*-Glycyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**10**)



Compound **S1** (44 mg, 0.082 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and  $H_2O$  at room temperature. After 10 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and  $H_2O$  were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (50:50:1  $CHCl_3/MeOH/Et_3N$ ) to afford compound **10** as a white solid (17 mg, 52%).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8.39 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.30 (br, 2H), 5.92 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 4.18–4.14 (m, 2H), 4.11–4.05 (m, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.94 (q,  $J = 7.5$  Hz, 1.3H,  $Et_3N-CH_2$ ), 1.12 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $Et_3N-CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  169.8, 156.1, 152.7, 149.6, 139.4, 118.9, 87.0, 82.4, 73.5, 70.7, 67.6, 45.6, 42.7, 9.1. HRMS (ESI+):  $[M+H]^+$  calcd for  $C_{12}H_{18}N_7O_7S$ , 404.0983; found, 404.0955.

### Chemical Synthesis of L-Ala-AMS 11

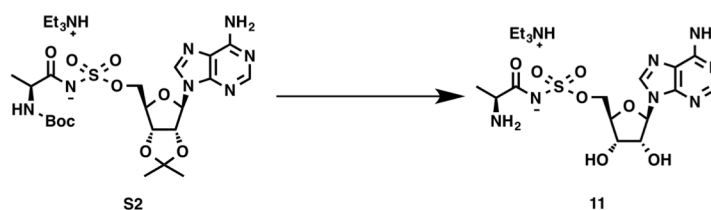
#### 5'-O-[*N*-(*N*-Boc-*L*-alanyl)sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine salt (**S2**) triethylammonium



Boc-Ala-OSu (56 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-O-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1  $CHCl_3/MeOH/Et_3N$ ) to afford compound **S2** as a white solid (39 mg, 53%).  $^1H$  NMR

(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.46 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 5.36 (q,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 5.15–5.08 (m, 1H), 4.55–4.50 (m, 1H), 4.26–4.18 (m, 2H), 4.03–3.90 (m, 1H), 3.18 (q,  $J = 7.5$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.60 (s, 3H), 1.45–1.35 (m, 12H), 1.32–1.22 (m, 12H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  181.4, 157.4, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.2, 91.8, 85.7, 85.6, 83.3, 80.0, 69.7, 53.7, 47.8, 28.8, 27.5, 25.6, 19.8, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S, 556.1826; found, 556.1833.

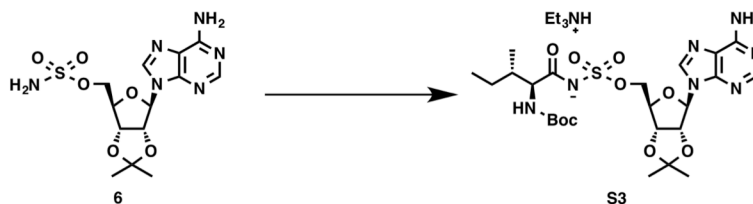
### 5'-O-N-(L-Alanyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**11**)



Compound **S2** (40 mg, 0.061 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 3 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N to 100:1 MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **11** as a white solid (21 mg, 77%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.27 (br, 2H), 5.91 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.18–4.12 (m, 2H), 4.11–4.03 (m, 2H), 3.48 (dd,  $J = 7.5, 6.9$  Hz, 1H), 2.73 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.30 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 1.03 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  173.2, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 118.9, 87.0, 82.5, 73.4, 70.7, 67.6, 50.7, 45.7, 17.2, 10.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S, 416.0988; found, 416.0983.

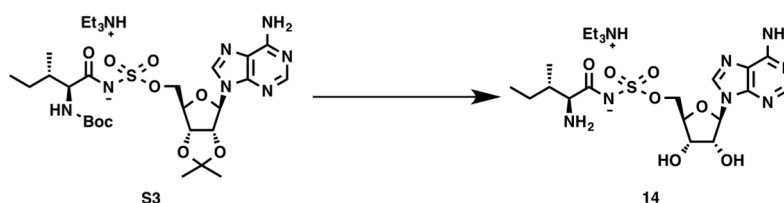
### Chemical Synthesis of L-Ile-AMS **14**

#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-isoleucyl)sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S3**)



Boc-Ile-OSu (64 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S3** as a white solid (69 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.40 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.35 (br, 2H), 6.16 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 5.8, 2.9 Hz, 1H), 5.00 (dd, *J* = 5.7, 1.7 Hz, 1H), 4.40–4.37 (m, 1H), 4.05–3.98 (m, 2H), 3.66 (dd, *J* = 8.6, 5.2 Hz, 1H), 2.81 (q, *J* = 7.5 Hz, 18H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.75–1.66 (m, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.31 (s, 3H), 1.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 27H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.83–0.76 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 175.8, 156.1, 155.1, 152.8, 149.0, 139.5, 118.9, 113.2, 89.2, 83.7, 83.5, 81.7, 77.5, 67.2, 60.5, 48.6, 39.2, 28.2, 27.1, 25.2, 24.3, 15.7, 11.7, 9.8. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S, 600.2446; found, 600.2417.

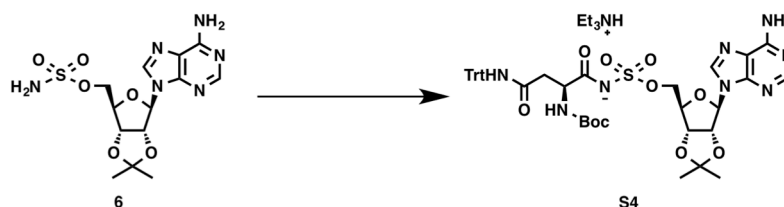
**5'-*O*-*N*-(*L*-Isoleucyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**14**)**



Compound **S3** (30 mg, 0.050 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 4 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (50:50:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **14** as a colorless oil (16 mg, 70%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.55 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.09 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.41–4.28 (m, 3H), 3.62–3.55 (m, 2H), 3.18 (q, *J* = 7.5 Hz, 36H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.64–1.55 (m, 1H), 1.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 54H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.04–0.92 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 175.0, 173.1, 150.6, 141.6, 137.6, 120.1, 89.5, 84.3, 79.5, 76.2, 69.0, 61.3, 47.4, 38.1, 25.7, 15.5, 12.2, 9.1. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S, 460.1614; found, 460.1604.

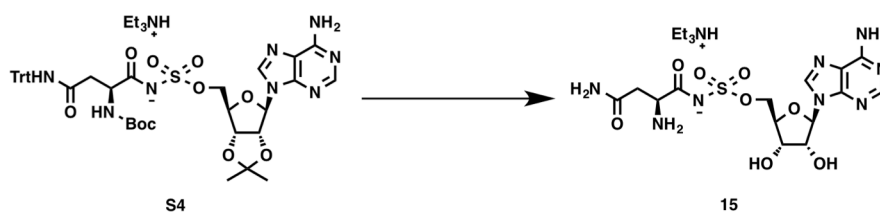
## Chemical Synthesis of L-Asn-AMS 15

### 5'-O-[N-(N-Boc-L-asparaginyl(Trt))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (S4)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (182 mg, 0.95 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (173 mg, 1.56 mmol) were added to a solution of Boc-Asn(Trt)-OH (300 mg, 0.63 mmol) in DMF (6 mL). After 3 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Boc-Asn(Trt)-OSu (155 mg, 0.27 mmol) and cesium carbonate (176 mg, 0.54 mmol) were added to a solution of 5'-O-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (70 mg, 0.18 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 90:10:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S4** as a white solid (150 mg, 88%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.42 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.27–7.14 (m, 15H), 6.22 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.32–5.27 (m, 1H), 5.09–5.05 (m, 1H), 4.52–4.48 (m, 1H), 4.35–4.28 (m, 1H), 4.23–4.16 (m, 2H), 3.12 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.90–2.81 (m, 1H), 2.70–2.62 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.33 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 179.4, 172.2, 157.6, 157.3, 154.0, 150.5, 146.0, 141.4, 130.1, 128.7, 127.7, 120.1, 115.2, 91.8, 85.7, 85.6, 83.2, 80.3, 71.6, 69.6, 55.7, 47.8, 41.3, 28.8, 27.5, 25.6, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>41</sub>H<sub>45</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S, 841.2979; found, 841.2958.

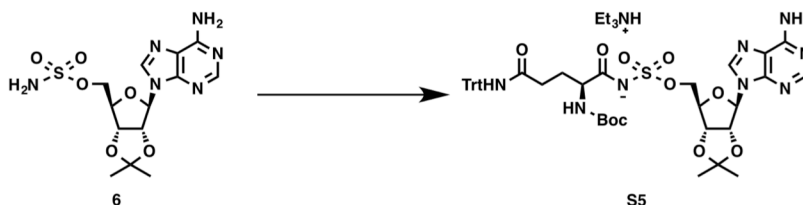
### 5'-O-N-(L-Asparaginyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (15)



Compound **S4** (100 mg, 0.12 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 2 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1 to 85:15:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **15** as a white solid (39 mg, 66%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.60 (br, 1H), 7.29 (br, 2H), 7.13 (br, 1H), 5.91 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.58 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.19–4.04 (m, 4H), 3.70 (dd, *J* = 9.2, 3.4 Hz, 1H), 2.81–2.72 (m, 1H, overlapping with Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.45 (dd, *J* = 16.6, 9.2 Hz, 1H), 1.04 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.5H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.9, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 118.9, 87.0, 82.4, 73.6, 70.7, 67.5, 51.8, 45.7, 35.5, 10.0. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S, 459.1052; found, 459.0755.

### Chemical Synthesis of L-Gln-AMS 16

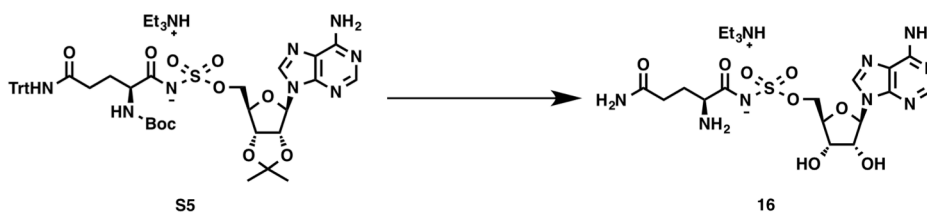
#### 5'-*O*-[N-(*N*-Boc-L-glutaminyl(Trt))sulfamoyl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S5**)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (240 mg, 1.20 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (140 mg, 1.20 mmol) were added to a solution of Boc-Gln(Trt)-OH (400 mg, 0.82 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The solution was stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (1:4 to 2:1 EtOAc/hexane) to afford Boc-Gln(Trt)-OSu as a white solid (410 mg, 86%). Boc-Gln(Trt)-OSu (110 mg, 0.19 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 90:10:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S5** as a colorless oil (99 mg, 77%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.48 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.30–7.15 (m, 15H), 6.21 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.32 (dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 6.0, 1.5 Hz, 1H), 4.50 (br, 1H), 4.23 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H),

4.05 (dd,  $J = 6.0, 5.0$  Hz, 1H), 3.06 (q,  $J = 7.5$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.41–2.24 (m, 2H), 2.10–1.94 (m, 1H), 1.94–1.79 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 1.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  180.0, 174.7, 157.6, 157.3, 154.0, 150.5, 146.0, 141.4, 130.0, 128.7, 127.7, 120.1, 115.2, 91.6, 85.6, 85.4, 83.1, 80.1, 71.5, 69.7, 57.5, 47.7, 34.3, 30.8, 28.8, 27.5, 25.6, 9.4. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S, 855.3141; found, 855.3157.

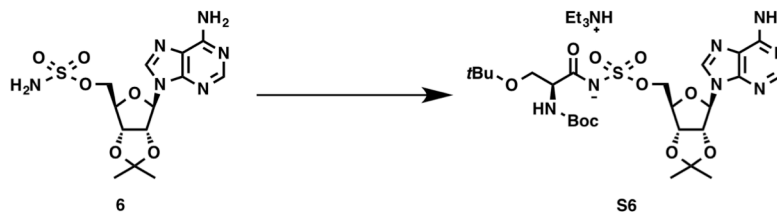
### 5'-O-N-(L-Glutaminy)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**16**)



Compound **S5** (35 mg, 0.035 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 30 min, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N to MeOH) to afford compound **16** as a white solid (7.5 mg, 40%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.51 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 6.09 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.63 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.41–4.27 (m, 4H), 3.68 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 3.14 (q,  $J = 7.5$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.47 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.18–2.03 (m, 2H), 1.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  181.5, 180.5, 157.3, 153.9, 150.8, 141.1, 120.2, 89.3, 84.4, 76.1, 72.2, 69.0, 60.6, 47.9, 30.9, 26.9, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S, 473.1209; found, 473.1208.

### Chemical Synthesis of L-Ser-AMS **17**

#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-seryl(*t*Bu))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S6**)

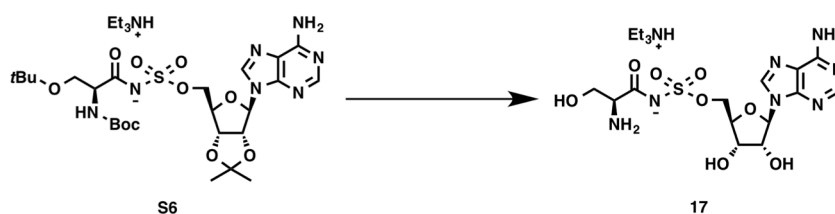


1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (160 mg, 0.81 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (94 mg, 0.81 mmol), DIEA (0.35 mL, 2.0 mmol), and DMAP (8.3 mg, 0.068 mmol) were added to a solution of Boc-Ser(*t*Bu)-OH·DCHA (300 mg,



0.68 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The solution was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was washed with a 0.1 M aqueous HCl solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (1:9 to 1:2 EtOAc/hexane) to afford Boc-Ser(*t*Bu)-OSu as a white solid (147 mg, 60%). Boc-Ser(*t*Bu)-OSu (70 mg, 0.19 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 80:20:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S6** as a colorless oil (61 mg, 65%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.49 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.24, (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 5.5, 3.5 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 4.5 Hz 1H), 4.54 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 1H), 4.27–4.19 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.76–3.68 (m, 1H), 3.63 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.18 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.61 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 3H), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.12 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 178.5, 157.5, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.2, 91.9, 85.7, 85.5, 83.4, 80.2, 74.3, 69.7, 64.2, 58.6, 47.8, 28.8, 27.8, 27.5, 25.6, 9.2. HRMS (ESI+): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S, 630.2552; found, 630.2552.

**5'-*O*-*N*-(*L*-Seryl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**17**)**

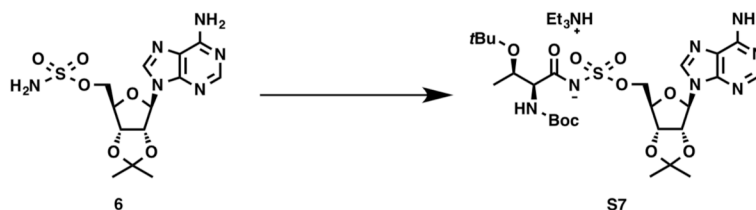


Compound **S6** (27.4 mg, 0.038 mmol) was dissolved in a 90:5:5 (v/v) mixture of TFA, H<sub>2</sub>O, and TIS at room temperature. After 30 min, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (80:20:1 to 50:50:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **17** as a white solid (4.7 mg, 23%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.50 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.09 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.43–4.26 (m, 3H), 3.97 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.93–3.78 (m, 2H), 3.75–3.66 (m, 1H), 3.19 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.5, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 118.9, 87.0, 82.5, 73.5, 70.7, 67.5, 60.8,

57.4, 45.5, 9.9. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S, 434.1089; found, 434.1086.

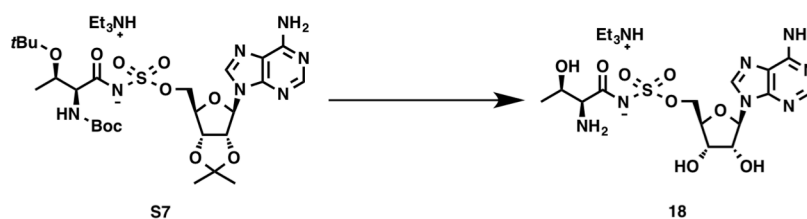
### Chemical Synthesis of L-Thr-AMS 18

#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-threonyl(*t*Bu))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (S7)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (170 mg, 0.87 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (100 mg, 0.87 mmol), DIEA (0.38 mL, 2.2 mmol), and DMAP (8.9 mg, 0.073 mmol) were added to a solution of Boc-Thr(*t*Bu)-OH (200 mg, 0.73 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The solution was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was washed with a 0.1 M aqueous HCl solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (1:5 to 1:2 EtOAc/hexane) to afford Boc-thr(*t*Bu)-OSu as a white solid (220 mg, 82%). Boc-Thr(*t*Bu)-OSu (72 mg, 0.19 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-O-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 80:20:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S7** as a white solid (62 mg, 63%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.49 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 11.0, 4.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 11.0, 3.0 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 7.5, 2.5 Hz, 1H), 3.11 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.61 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.38 (s, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 179.2, 158.1, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.2, 91.9, 85.7, 85.6, 83.4, 80.2, 74.9, 69.7, 63.4, 47.8, 29.0, 28.8, 27.5, 25.7, 21.9, 9.4. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S, 642.2563; found, 642.2561.

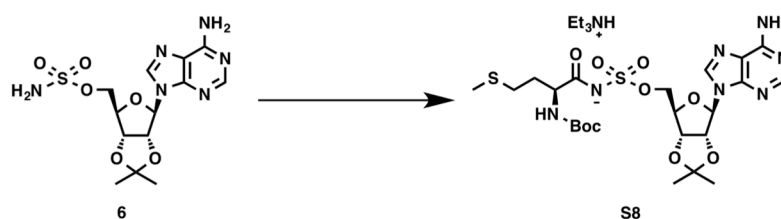
### 5'-O-N-(L-Threonyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**18**)



Compound **S7** (41 mg, 0.054 mmol) was dissolved in a 90:5:5 (v/v) mixture of TFA, H<sub>2</sub>O, and TIS at room temperature. After 30 min, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1 to 60:40:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **18** as a white solid (13 mg, 49%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.51 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.08 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.61 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.45–4.27 (m, 4H), 4.19 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.45 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.13 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.31 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 174.6, 157.2, 153.9, 150.7, 141.2, 120.1, 89.5, 84.2, 76.2, 71.9, 68.9, 67.6, 62.9, 47.8, 21.0, 9.4. HRMS (ESI+): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S, 448.1245; found, 448.1220.

### Chemical Synthesis of L-Met-AMS **19**

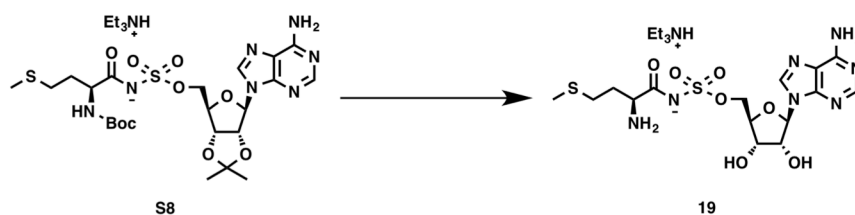
#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-methionyl)sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S8**)



Boc-Met-OSu (68 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-O-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (94:6:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S8** as a white solid (80 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.47 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.38–5.33 (m, 1H), 5.14–5.09 (m, 1H), 4.56–4.52 (m, 1H), 4.27–4.22 (m, 2H), 4.11–4.00 (m, 1H),

3.19 (q,  $J = 7.5$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.53–2.45 (m, 2H), 2.08–2.00 (m, 4H), 1.90–1.80 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.39 (s, 3H), 1.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  180.2, 157.6, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.3, 91.8, 85.7, 85.6, 83.3, 80.1, 69.7, 57.4, 47.9, 34.3, 31.2, 28.8, 27.5, 25.6, 15.3, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>, 616.1859; found, 616.1861.

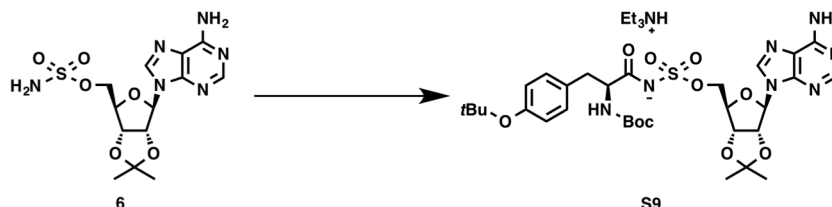
### 5'-O-N-(L-Methionyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**19**)



Compound **S8** (40 mg, 0.061 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 3 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (75:25:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **19** as a white solid (12 mg, 57%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.26 (br, 2H), 5.90 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.59 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.28–4.23 (m, 2H), 4.11–4.04 (m, 2H), 5.52 (dd,  $J = 6.9, 5.2$  Hz, 1H), 2.64 (q,  $J = 7.5$  Hz, 1.5H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.58–2.52 (m, 1H), 2.05–1.98 (m, 4H), 1.91–1.82 (m, 1H), 1.10 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2.3H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172.2, 156.0, 152.7, 149.5, 139.4, 118.9, 87.1, 82.4, 73.4, 82.4, 73.4, 70.7, 67.6, 53.8, 45.7, 30.9, 29.0, 14.3, 10.6. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, 476.1022; found, 476.1027.

### Chemical Synthesis of L-Tyr-AMS **20**

#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-tyrosyl(*t*Bu))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S9**)

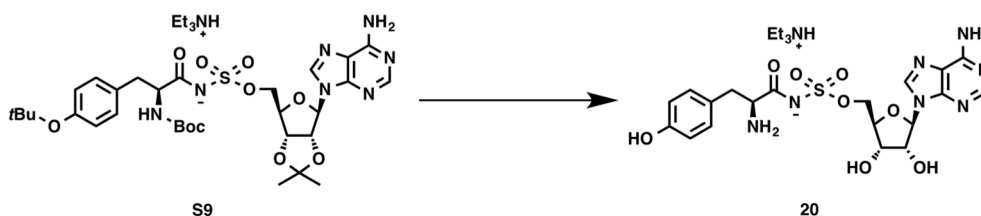


1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (127 mg, 0.66 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (76 mg, 0.66 mmol) were added to a solution of Boc-Tyr(*t*Bu)-OH (100 mg, 0.30 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). The solution was stirred at

room temperature for 12 h. The reaction mixture was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to afford Boc-Tyr(*t*Bu)-OSu as a colorless oil (120 mg, 92%).

Boc-Tyr(*t*Bu)-OSu (120 mg, 0.28 mmol) and cesium carbonate (293 mg, 0.90 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (58 mg, 0.15 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S9** as a colorless oil (104 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.46 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.24 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.36 (dd, *J* = 5.7, 2.9 Hz, 1H), 5.11 (dddd, *J* = 7.3, 7.3, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 4.57–4.49 (m, 1H), 4.24–4.15 (m, 2H), 3.45–3.32 (m, 1H), 3.16 (q, *J* = 7.5 Hz, 18H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.89–2.70 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.38 (s, 9H), 1.35 (s, 3H), 1.30 (s, 9H), 1.27 (t, *J* = 7.5, 27H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 178.7, 157.3, 154.8, 154.0, 150.5, 141.4, 134.9, 134.4, 131.0, 124.9, 120.1, 115.2, 91.8, 85.7, 83.2, 79.9, 79.3, 69.7, 58.3, 47.6, 39.2, 29.2, 28.8, 27.5, 25.6, 9.16. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S, 704.2714; found, 704.2722.

#### 5'-*O*-(*N*-*L*-Tyrosyl)sulfamoyl-adenosine triethylammonium salt (**20**)

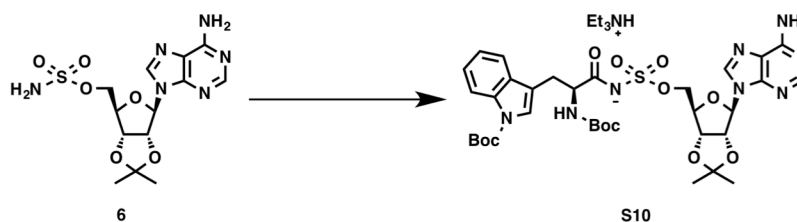


Compound **S9** (58 mg, 0.082 mmol) was dissolved in a mixture of 90:5:5 (v/v) of TFA, H<sub>2</sub>O, and TIS at room temperature. After 8 h, the flask was placed on the rotary evaporator, and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by HPLC [COSMISIL 5C<sub>18</sub>-PAQ: C-18 reverse-phase column, φ 10 mm × 250 mm, acetonitrile/aqueous TFA (0.1%, 10:90), 3.0 mL/min, 220 nm, *t*<sub>R</sub>: 12.5 min] to afford compound **20** as a yellow oil (31 mg, 74%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.60 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.14 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.63 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.44–4.35 (m, 3H), 4.34–4.29 (m, 1H), 3.94 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.25–3.16 (m, 1H, overlapping with Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 3.08–2.96 (m, 1H). NMR data

were in agreement with published data.<sup>55</sup> HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S, 508.1251; found, 508.1280.

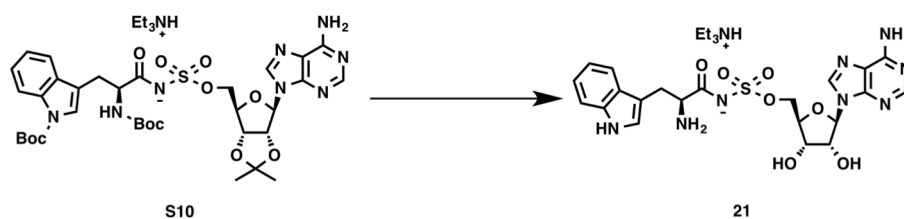
### Chemical Synthesis of L-Trp-AMS 21

#### 5'-O-[N-(N-Boc-L-tryptophanyl(Boc))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (S10)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (230 mg, 1.2 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (138 mg, 1.2 mmol) were added to a solution of Boc-Trp(Boc)-OH (405 mg, 1.0 mmol) in DMF (10 mL). After 6 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Boc-Trp(Boc)-OSu (98 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **S1** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 91:9:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S10** as a white solid (65 mg, 57%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.45 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.09–8.00 (m, 1H), 7.72–7.59 (m, 1H), 7.52–7.43 (m, 1H), 7.28–7.13 (m, 2H), 6.21 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.36–5.27 (m, 1H), 5.12–5.00 (m, 1H), 4.55–4.45 (m, 1H), 4.37–4.11 (m, 3H), 3.28–3.21 (m, 1H), 3.12 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 3.04–2.95 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.59 (s, 3H), 1.40–1.29 (m, 12H), 1.23 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 179.6, 157.3, 154.0, 151.1, 150.5, 141.4, 136.7, 132.4, 125.2, 125.1, 123.5, 120.5, 120.1, 118.1, 115.9, 115.2, 91.8, 85.7, 85.5, 84.5, 83.2, 80.1, 69.7, 58.4, 47.8, 29.6, 28.7, 28.4, 28.2, 27.5, 25.5, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S, 771.2772; found, 771.2781.

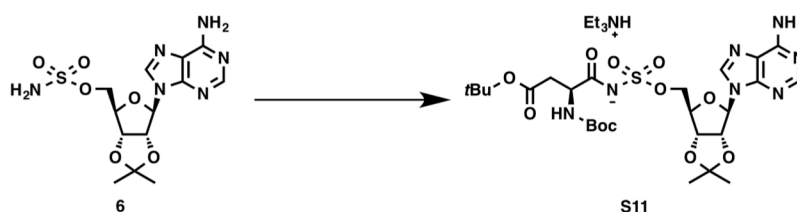
### 5'-*O*-*N*-(*L*-Tryptophanyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**21**)



Compound **S10** (40 mg, 0.046 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 3 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **21** as a white solid (25 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.9 (br, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.26 (br, 2H), 7.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 6.9 Hz, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.92 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.64–4.59 (m, 1H), 4.20–4.15 (m, 2H), 4.14–4.05 (m, 2H), 3.67 (dd, *J* = 8.6, 4.6 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 14.9, 4.0 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 14.9, 8.6 Hz, 1H), 2.57 (q, *J* = 7.5 Hz, 3H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 0.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 4.5H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.7, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 136.3, 127.2, 124.5, 121.0, 118.9, 118.5, 118.3, 111.4, 108.2, 87.1, 82.5, 79.2, 73.5, 70.7, 67.5, 55.7, 45.7, 27.5, 10.9. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>S, 531.1410; found, 531.1413.

### Chemical Synthesis of *L*-Asp-AMS **22**

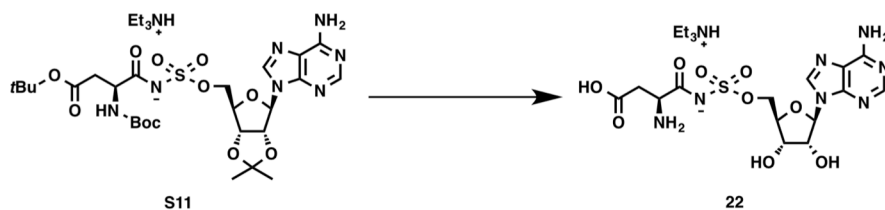
#### 5'-*O*-[*N*-(*N*-Boc-*L*-aspartyl (*t*Bu))sulfamoyl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S11**)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (298 mg, 1.56 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (180 mg, 1.56 mmol) were added to a solution of Boc-Asp(O*t*Bu)-OH (300 mg, 1.04 mmol) in DMF (10 mL). After 22 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to

dryness. Boc-Asp(O*t*Bu)-OSu (75 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (94:6:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S11** as a white solid (50 mg, 66%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.46 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.38–5.34 (m, 1H), 5.14–5.10 (m, 1H), 4.55–4.52 (m, 1H), 4.33–4.28 (m, 1H), 4.25–4.20 (m, 2H), 3.18 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.75 (dd, *J* = 15.5, 5.2 Hz, 1H), 2.56 (dd, *J* = 15.5, 7.5 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.44–1.37 (m, 21H), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 178.9, 172.5, 157.4, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.2, 91.9, 85.7, 85.6, 83.3, 81.9, 80.2, 69.6, 55.0, 47.8, 40.2, 28.8, 28.4, 27.5, 25.6, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S, 656.2350; found, 656.2346.

**5'-*O*-*N*-(L-Aspartyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**22**)**

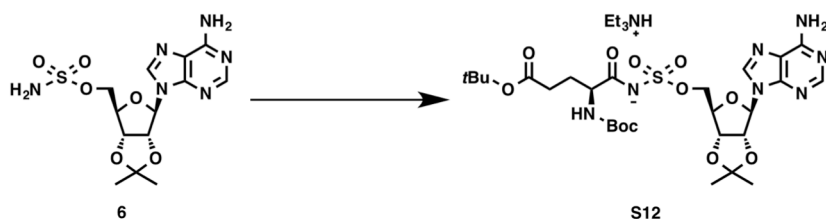


Compound **S11** (40 mg, 0.053 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 6 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **22** as a white solid (26 mg, 83%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.39 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.27 (br, 2H), 5.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.60–4.55 (m, 1H), 4.18–4.00 (m, 4H), 3.58–3.54 (m, 1H), 2.86 (q, *J* = 7.5 Hz, 8H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.55 (dd, *J* = 16.6, 4.0 Hz, 1H), 2.36 (dd, *J* = 16.6, 8.6 Hz, 1H), 1.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 12H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.5, 172.3, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 118.8, 87.0, 82.4, 73.5, 70.6, 67.5, 52.7, 45.4, 36.3, 9.4. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S, 460.0887; found, 460.0882.



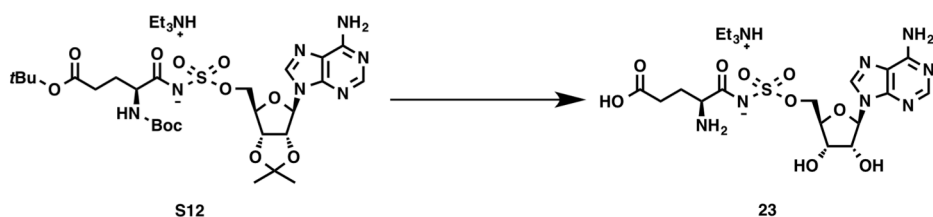
## Chemical Synthesis of L-Glu-AMS 23

### 5'-O-[N-(N-Boc-L-glutamyl(*t*Bu))sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (S12)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (380 mg, 1.98 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (228 mg, 1.98 mmol) were added to a solution of Boc-Glu(*O**t*Bu)-OH (500 mg, 1.65 mmol) in DMF (16 mL). After 24 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Boc-Glu(*O**t*Bu)-OSu (78 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 91:9:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S12** as a white solid (76 mg, 76%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.46 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.37–5.33 (m, 1H), 5.12–5.08 (m, 1H), 4.56–4.51 (m, 1H), 4.27–4.21 (m, 2H), 4.04–3.97 (m, 1H), 3.18 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.34–3.22 (m, 2H), 2.11–2.01 (m, 1H), 1.89–1.80 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.46–1.35 (m, 21H), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 180.0, 174.3, 157.5, 157.3, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.2, 91.8, 85.7, 85.5, 83.3, 81.4, 80.1, 69.7, 57.4, 47.8, 32.8, 29.8, 28.8, 28.3, 27.5, 25.6, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S, 670.2507; found, 670.2509.

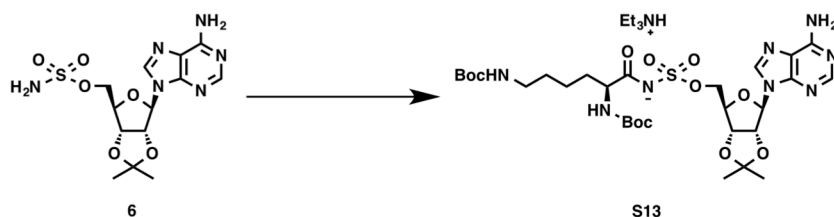
### 5'-*O*-N-(L-Glutamyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (23)



Compound **S12** (40 mg, 0.052 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 3 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N to 100:1 MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **23** as a white solid (32 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.37 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.26 (br, 2H), 5.90 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.60–4.57 (m, 1H), 4.17–4.04 (m, 4H), 3.44 (dd, *J* = 6.8, 4.6 Hz, 1H), 2.70 (q, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.39–2.21 (m, 2H), 2.00–1.91 (m, 1H), 1.85–1.77 (m, 1H), 1.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 15H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 175.2, 172.6, 156.0, 152.6, 149.6, 139.3, 118.9, 87.0, 82.5, 73.5, 70.7, 67.5, 54.7, 45.5, 32.1, 27.1, 10.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S, 474.1043.; found, 474.1045.

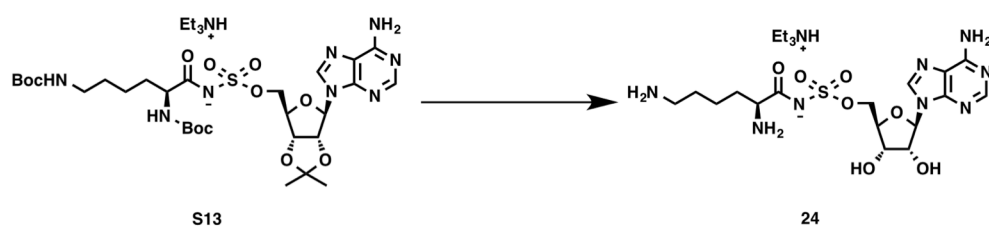
### Chemical Synthesis of L-Lys-AMS 24

#### 5'-*O*-[N-(N-Boc-L-lysyl(ε-Boc))sulfamoyl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S13**)



Boc-Lys(Boc)-OSu (127 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (90:10:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S13** as a white solid (106 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.51 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 5.7, 3.4 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.56 (dd, *J* = 5.2, 3.5 Hz, 1H), 4.27–4.20 (m, 2H), 4.01–3.95 (m, 1H), 3.14 (q, *J* = 7.5 Hz, 12H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 3.04–2.99 (m, 2H), 1.82–1.72 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.49–1.42 (m, 22H), 1.39 (s, 3H), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 18H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.9, 158.4, 157.6, 157.6, 157.3, 154.0, 150.4, 120.1, 115.2, 91.7, 85.7, 85.6, 83.2, 80.0, 79.7, 69.7, 58.0, 47.7, 41.1, 34.3, 34.2, 34.1, 30.6, 28.8, 27.5, 25.6, 24.1, 9.3. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S, 715.3080; found, 715.3039.

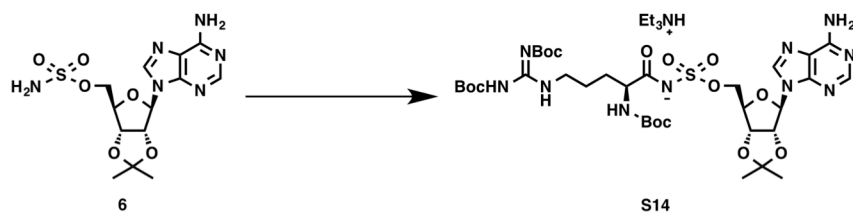
### 5'-*O*-(*N*-L-Lysyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**24**)



Compound **S13** (50 mg, 0.070 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 10 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by HPLC [COSMISIL 5C<sub>18</sub>-PAQ: C-18 reverse-phase column, φ 10 mm × 250 mm, aqueous TFA (0.01%), 3.0 mL/min, 220 nm, *t*<sub>R</sub>: 9.5 min] to afford compound **24** as a colorless oil (20 mg, 61%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.63 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 6.14 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.47–4.39 (m, 3H), 4.33 (dd, *J* = 7.5, 2.9 Hz, 1H), 3.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.21 (q, *J* = 7.5 Hz, 3H, E<sub>3</sub>tN-CH<sub>2</sub>), 2.94 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.00–1.86 (m, 2H), 1.74–1.68 (m, 2H), 1.58–1.49 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 4.5H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 174.1, 152.3, 150.1, 146.2, 143.6, 120.2, 90.2, 84.2, 76.2, 71.8, 70.0, 56.0, 47.8, 40.3, 31.7, 28.0, 22.8, 9.1. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>S, 475.1718; found, 475.1691.

### Chemical Synthesis of L-Arg-AMS **25**

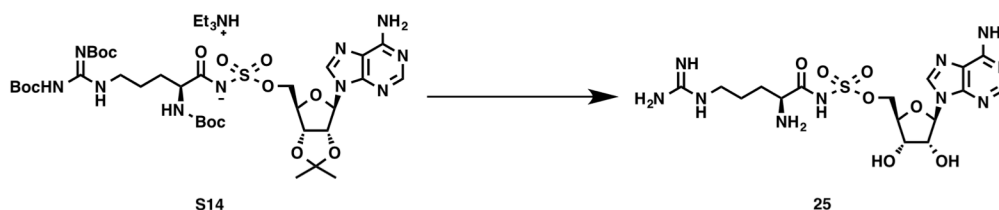
#### 5'-*O*-[*N*-(*N*-Boc-L-arginyl (Boc)<sub>2</sub>)sulfamoyl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S14**)



1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (150 mg, 0.76 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (87 mg, 0.76 mmol) were added to a solution of Boc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH (300 mg, 0.63 mmol) in THF (6 mL) at room temperature. After 15 h, the solvent was evaporated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (9:1 to 3:1 EtOAc/hexane) to afford Boc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OSu as a white solid (250 mg, 68%). Boc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OSu (110 mg, 0.19 mmol) and cesium carbonate

(127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-*O*-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 90:10:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S14** as a white solid (99 mg, 78%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.48 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.33 (dd, *J* = 6.0, 3.0 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 1H), 4.52 (dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 4.04–3.94 (m, 1H), 3.94–3.76 (m, 3H), 3.17 (q, *J* = 7.5 Hz, 6 H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.78 (br, 1H), 1.63 (br, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.44–1.36 (m, 9H), 1.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.4, 157.5, 157.3, 156.14, 156.11, 154.0, 150.5, 141.4, 120.1, 115.3, 91.7, 85.8, 85.5, 85.1, 85.0, 83.2, 80.0, 79.9, 69.7, 57.9, 47.7, 45.8, 31.7, 28.8, 28.7, 28.3, 27.3, 26.3, 26.2, 25.6, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>S, 841.3520; found, 841.3521.

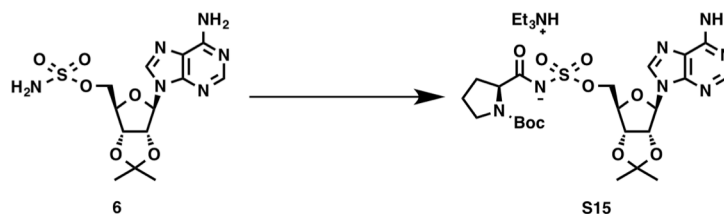
#### 5'-*O*-*N*-(L-Arginyl)sulfamoyl-adenosine (**25**)



Compound **S14** (40 mg, 0.10 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 2 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (50:50:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N to 100:1 MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **25** as a white solid (14 mg, 70%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.52 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 6.09 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 11.0, 3.0 Hz, 1H), 4.34–4.27 (m, 2H), 3.34–3.32 (m, 1H), 3.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.82–1.70 (m, 1H), 1.70–1.60 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 178.6, 156.8, 156.0, 152.6, 149.6, 139.4, 118.8, 86.8, 82.7, 73.7, 70.7, 67.2, 56.1, 40.6, 31.8, 25.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>S, 501.1634; found, 501.1639.

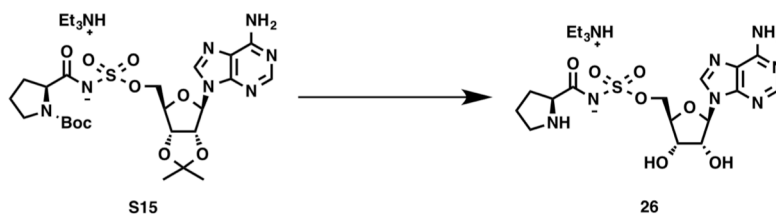
## Chemical Synthesis of L-His-AMS 26

### 5'-O-[N-(N-Boc-L-histidyl)sulfamoyl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine triethylammonium salt (**S15**)



Boc-His(Boc)-OSu (88 mg, 0.20 mmol) and cesium carbonate (127 mg, 0.39 mmol) were added to a solution of 5'-O-sulfamoyl-2',3'-isopropylideneadenosine **6** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (95:5:1 to 83:17:1 EtOAc/MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **S15** as a white solid (55 mg, 59%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.47 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.36–5.31 (m, 1H), 5.11–5.07 (m, 1H), 4.55–4.51 (m, 1H), 4.30–4.19 (m, 3H), 3.18 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 3.10–3.01 (m, 1H), 2.93–2.85 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.58 (s, 9H), 1.39–1.36 (m, 12H), 1.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 179.5, 157.4, 157.3, 154.0, 150.5, 148.2, 141.4, 140.7, 137.8, 120.1, 116.0, 115.2, 91.8, 86.8, 85.7, 85.5, 83.3, 80.1, 69.7, 57.6, 47.8, 32.8, 28.8, 28.6, 28.0, 27.5, 25.6, 9.2. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S, 722.2568; found, 722.2571.

### 5'-O-N-(L-Histidyl)sulfamoyladenosine triethylammonium salt (**26**)



Compound **S15** (40 mg, 0.061 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of TFA and H<sub>2</sub>O at room temperature. After 3 h, the flask was placed on the rotary evaporator and the TFA and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (67:33:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N to 100:1 MeOH/Et<sub>3</sub>N) to afford compound **26** as a white solid (17 mg, 74%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.37 (s,

1H), 8.13 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.27 (br, 2H), 6.93 (s, 1H), 5.91 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.62–4.57 (m, 1H), 4.19–4.14 (m, 1H), 4.13–4.07 (m, 2H), 4.04–4.00 (m, 1H), 3.63 (dd,  $J = 9.2, 3.4$  Hz, 1H), 3.11 (dd,  $J = 14.9, 3.4$  Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 14.9, 9.2$  Hz, 1H), 2.66 (q,  $J = 7.5$  Hz, 4H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.01 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  171.9, 156.0, 152.7, 149.6, 139.4, 135.0, 118.9, 87.0, 82.5, 73.5, 70.7, 67.4, 55.6, 45.7, 28.7, 10.6. HRMS (ESI<sup>-</sup>): [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>S, 482.1206; found, 482.1212.

### Chemical Biology Procedures

**Protein Expression and Materials:** Recombinant proteins *holo*-GrsA and *holo*-TycB<sub>1</sub> were expressed and purified as described previously.<sup>25, 41, 56, 57</sup> Recombinant *holo*-GrsA and *holo*-TycB<sub>1</sub> were overproduced and isolated as C-terminal His-tagged constructs using the *E. coli* overexpression strain, BL21 (DE3), kindly provided by Prof. Mohamed A. Marahiel at Philipps-Universität Marburg, Germany.

**Hydroxamate-MesG Assay**<sup>20</sup> *Standard assay conditions:* Reactions contained *holo*-GrsA (140–1400 nM) to maintain initial velocity conditions, 20 mM Tris (pH 8.0), 2.5 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 150 mM hydroxylamine (pH 7.0), 0.1 U purine nucleoside phosphorylase (Sigma–Aldrich, N8264), 0.04 U inorganic pyrophosphatase (Sigma–Aldrich, I1643), 0.2 mM MesG (Berry & Associates) and varying concentrations of substrates. The reactions (100  $\mu$ L) were run in 96-well half-area plates (Corning, 3881) and the cleavage of MesG was monitored at  $A_{355}$  on an EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Working stocks of hydroxylamine were prepared fresh by combining 500  $\mu$ L of 4 M hydroxylamine, 250  $\mu$ L of water and 250  $\mu$ L of 7 M NaOH on ice. *Determination of kinetic parameters:* Steady-state kinetic parameters of the substrates were determined for *holo*-GrsA using standard assay conditions as described above. GrsA was used at 700 nM with L-Leu (0.625–10 mM), 1.4  $\mu$ M with L-Thr (25–300 nM), 140 nM with L-Met (2.5–100 mM), 700 nM with L-Trp (0.125–2.0 mM), and 1.4  $\mu$ M with L-His (3.125–100 mM). TycB<sub>1</sub> was used at 400 nM with L-Pro (10–2000  $\mu$ M). In all experiments, the total DMSO concentration was kept at or below 2.0%. Initial velocities were fit to the Michaelis-Menten equation using Prism 5 (GraphPad Software).

**Bacterial strains:** *A. migulanus* ATCC 9999 and DSM 5759 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), respectively.

**Cultivation media:** YPG media comprises yeast extract (50 g/L), Bacto Peptone (50 g/L), and glucose (5 g/L).<sup>58</sup>

**Preparation of Cellular Lysates for Proteomic Labeling Experiments:** *A. migulanus* ATCC 9999 and DSM 5756 were maintained on nutrient agar. Single colonies were used to inoculate YPG medium and cultures were shaken for 24 h at 37 °C. The seed culture (2 mL) was transferred to YPG media (250 mL) and the resulting mixture was incubated at 37 °C. Growth was routinely monitored at  $A_{660}$  on a U-2910 spectrophotometer (Hitachi). The cells were harvested by centrifugation and stored in the freezer until used. The frozen cell pellets were resuspended in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0.05% NP-40, and a protease inhibitor cocktail. Because of the lability of the synthetase during mechanical cell disruption processes,<sup>64</sup> a gentle treatment of cells with lysozyme (0.2 mg/mL) was used to release intracellular protein. The cell suspension was incubated at 0 °C for 30 min. The mixture was then incubated at 30 °C for 30 min. The solution was centrifuged for 5 min at 15,000 rpm and the pellets were discarded. The total protein concentration was quantitated by the method of Bradford.<sup>60</sup>

**Competitive ABPP of the A-domain of endogenous GrsA in a complex proteome:** *A. migulanus* ATCC 9999 proteome (2.0 mg/mL) was individually treated with inhibitors **7–26** (100 μM from a 10 mM stock in DMSO) in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0.05% NP-40, 0.2 mg/mL lysozyme and the protease inhibitor cocktail. These samples were incubated for 10 min at room temperature and subsequently treated with probe **1** (1 μM from a 100 μM stock in DMSO). In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.2%. After 10 min at room temperature, these samples were irradiated at 365 nm for 30 min on ice. To initiate the click reaction, rhodamine (Rh)-azide, TCEP, TBTA ligand, and CuSO<sub>4</sub> were added to provide final concentrations of 100 μM, 1 mM, 100 μM, and 1 mM, respectively. After 1 h at room temperature, 5× SDS-loading buffer (strong reducing) was added and the samples were heated at 95 °C for 5 min. Samples were separated by 1D SDS-PAGE and fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare). IC<sub>50</sub> values for the A-domain of GrsA were determined from dose–

response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Phe-AMS **7**: 1 nM to 10  $\mu$ M; L-Leu-AMS **13**: 10 nM to 1 mM; L-Met-AMS **19**: 10 nM to 1 mM; L-Trp-AMS **21**: 10 nM to 1 mM; L-His-AMS **26**: 10 nM to 1 mM; L-Thr-AMS **18**: 10 nM to 1 mM; L-Lys-AMS **24**: 10 nM to 1 mM) using Prism 5 (GraphPad Software).

**Competitive ABPP of the A-domain of recombinant GrsA:** Recombinant GrsA (1  $\mu$ M) were individually treated with inhibitors **7–26** (100  $\mu$ M from a 10 mM stock in DMSO) in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, and 0.0025% NP-40. These samples were incubated for 10 min at room temperature and subsequently treated with probe **1** (1  $\mu$ M from a 100  $\mu$ M stock in DMSO). In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.2%. After 10 min at room temperature, these samples were irradiated at 365 nm for 30 min on ice and reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5 $\times$  SDS-loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare). IC<sub>50</sub> values for the A-domain of GrsA were determined from dose–response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Phe-AMS **7**: 1 nM to 100  $\mu$ M; L-Leu-AMS **13**: 10 nM to 1 mM; L-Met-AMS **19**: 10 nM to 1 mM; L-Trp-AMS **21**: 10 nM to 1 mM; L-His-AMS **26**: 10 nM to 1 mM; L-Thr-AMS **18**: 10 nM to 1 mM; L-Lys-AMS **24**: 10 nM to 1 mM) using Prism 5 (GraphPad Software).

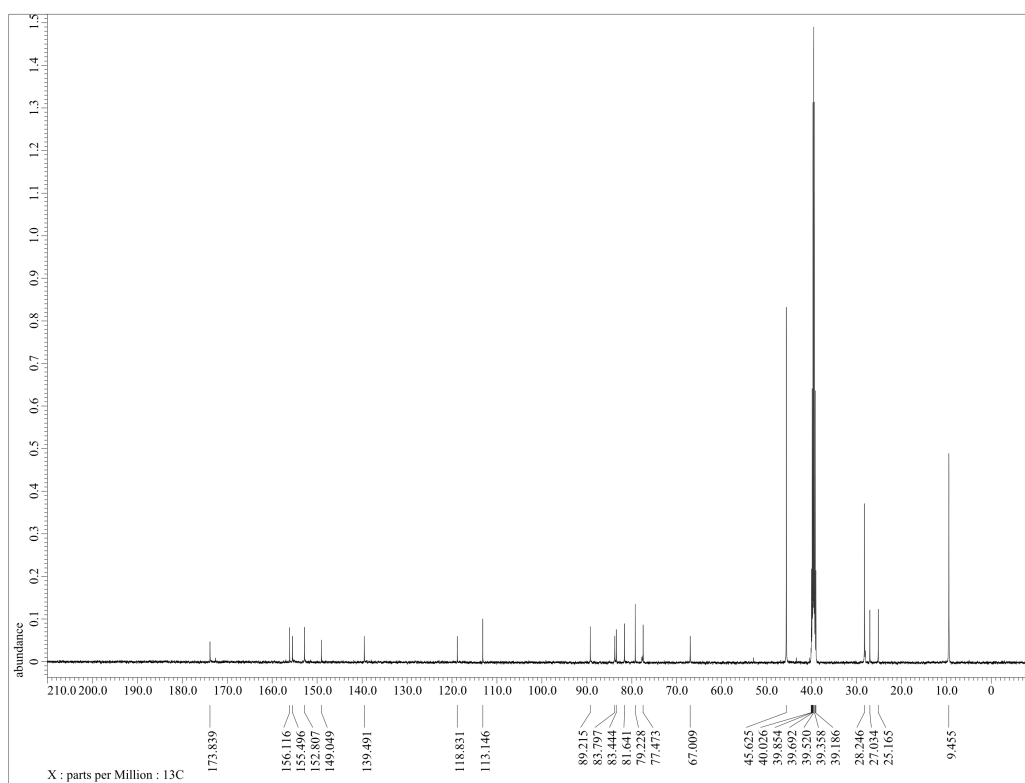
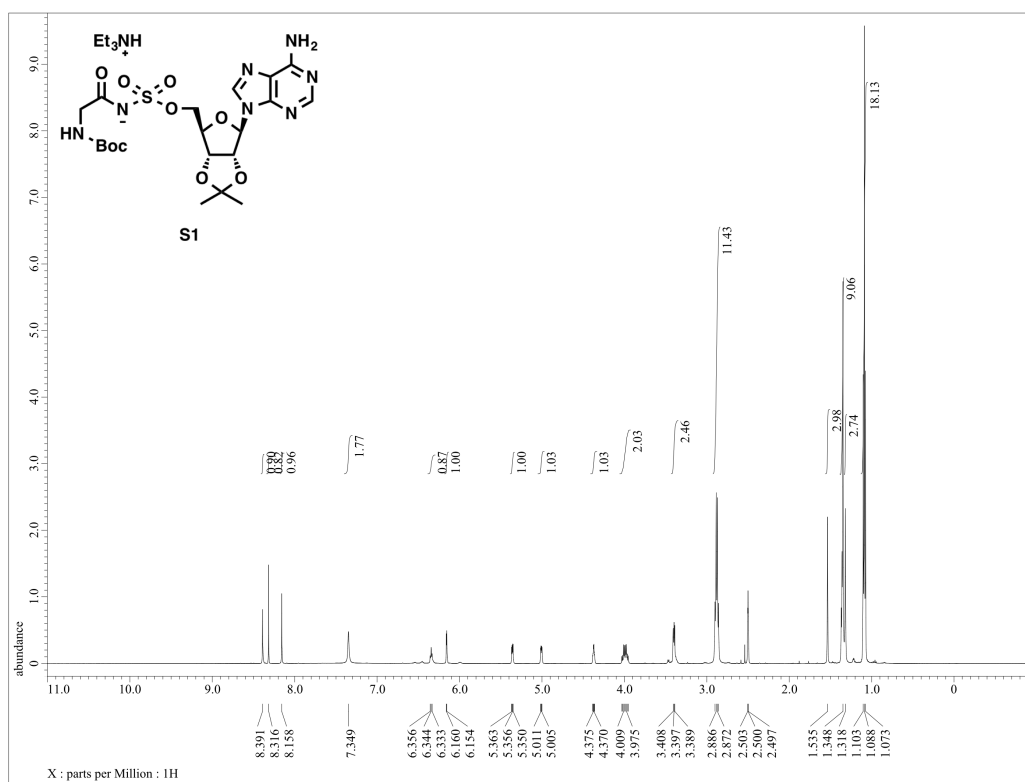
**Competitive ABPP of the A-domains of endogenous GrsB in a complex proteome:** *A. migulanus* DSM 5759 proteome (2.0 mg/mL) was individually treated with inhibitors **7–26** (100  $\mu$ M from a 10 mM stock in DMSO) in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0.05% NP-40, 0.2 mg/mL lysozyme, and the protease inhibitor cocktail. These samples were incubated for 10 min at room temperature and subsequently treated with individual members of probes **2–5** (1  $\mu$ M from a 100  $\mu$ M stock in DMSO). In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.2%. After 10 min at room temperature, these samples were irradiated at 365 nm for 5 min on ice and reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5 $\times$  SDS-loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare). IC<sub>50</sub> values for the L-Pro activating domain of GrsB were determined from dose–response curves from two trials at various inhibitor concentrations (L-Pro-AMS **8**: 0.01 nM to 10  $\mu$ M; L-Orn-AMS **9**: 100 nM to 1 mM; L-Gln-AMS **16**: 100 nM to 1 mM). IC<sub>50</sub> values for the L-Orn



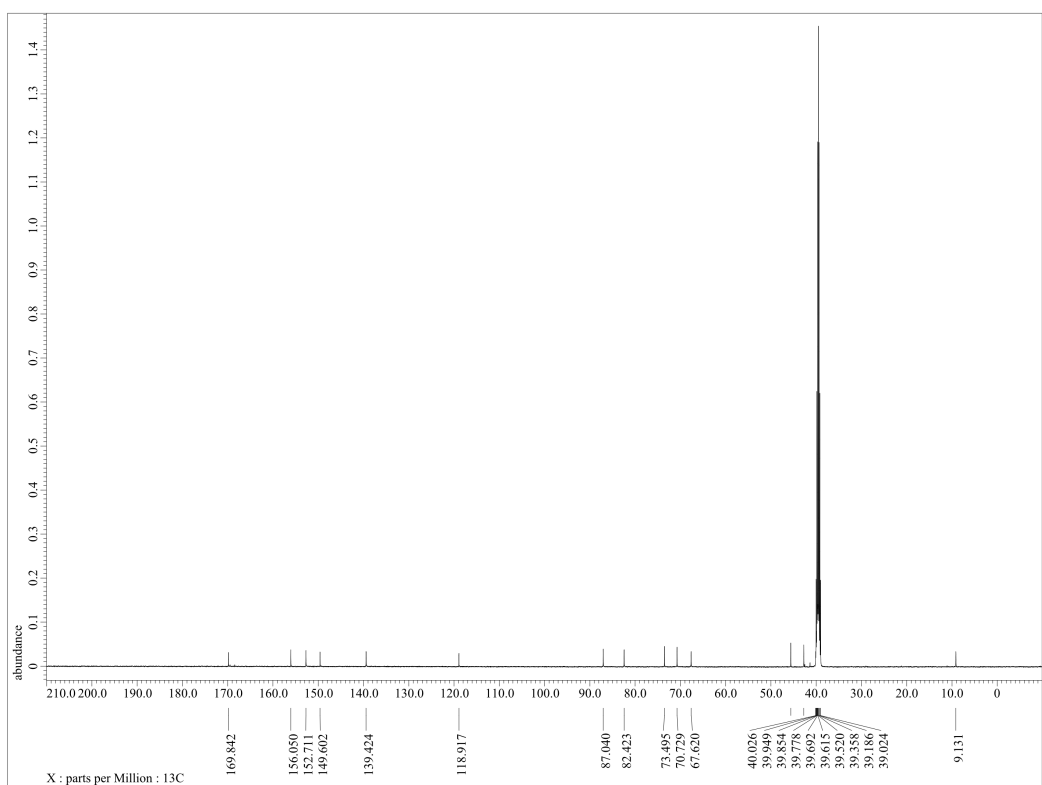
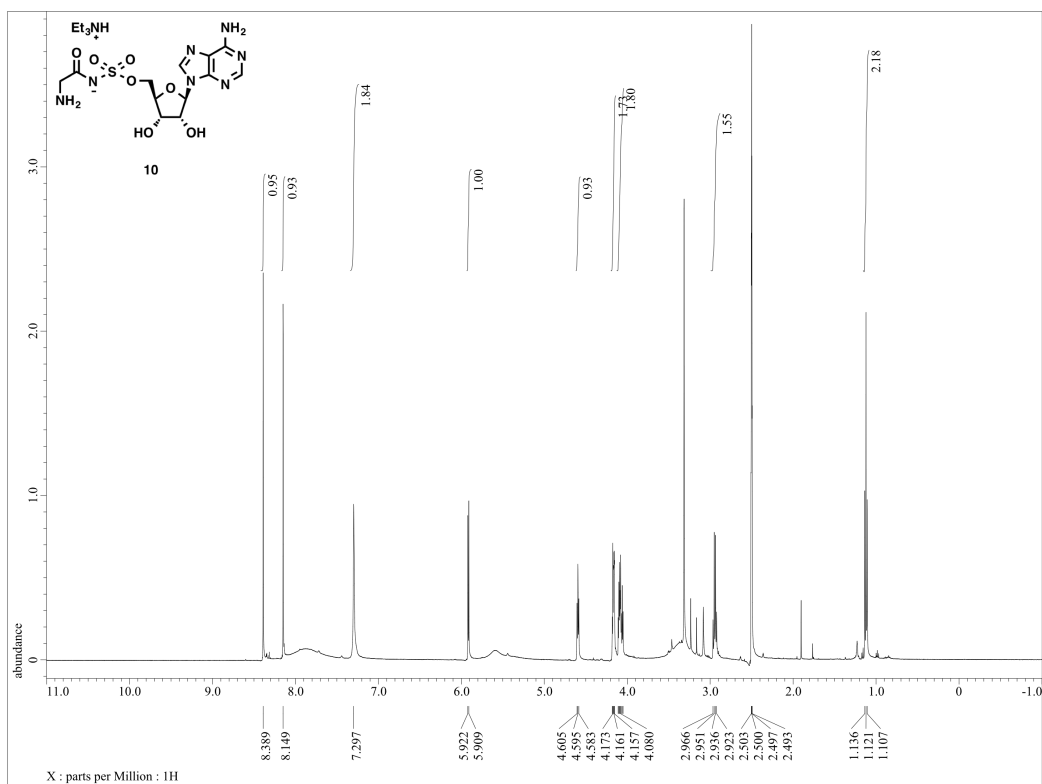
activating domain of GrsB were determined from dose–response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Orn-AMS **9**: 0.1 pM to 100 nM; L-Gln-AMS **16**: 100 nM to 1 mM; L-Lys-AMS **24**: 100 nM to 1 mM; L-Arg-AMS **25**: 100 nM to 1 mM). IC<sub>50</sub> values for the L-Val activating domain of GrsB were estimated from dose–response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Val-AMS **12**: 0.1 nM to 100 μM; L-Leu-AMS **13**: 100 nM to 100 μM; L-Ile-AMS **14**: 100 nM to 100 μM; L-Met-AMS **19**: 100 nM to 100 μM; L-Trp-AMS **21**: 100 nM to 100 μM; L-His-AMS **26**: 100 nM to 100 μM). IC<sub>50</sub> values for the L-Leu activating domain of GrsB were estimated from dose–response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Leu-AMS **13**: 0.1 nM to 100 μM; L-Met-AMS **19**: 100 nM to 100 μM).

**Competitive ABPP of the A-domain of recombinant TycB<sub>1</sub>:** Recombinant TycB<sub>1</sub> (1 μM) were individually treated with inhibitors **7–26** (100 μM from a 10 mM stock in DMSO) in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, and 0.0025% NP-40. These samples were incubated for 10 min at room temperature and subsequently treated with probe **2** (1 μM from a 100 μM stock in DMSO). In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.2%. After 10 min at room temperature, these samples were irradiated at 365 nm for 30 min on ice and reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5× SDS- loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare). IC<sub>50</sub> values for the A-domain of TycB<sub>1</sub> were determined from dose–response curves from two trials at each inhibitor concentration (L-Pro-AMS **8**: 1 nM to 100 μM; L-Orn-AMS **9**: 100 nM to 1 mM; L-Gln-AMS **16**: 100 nM to 1 mM) using Prism 5 (GraphPad Software).

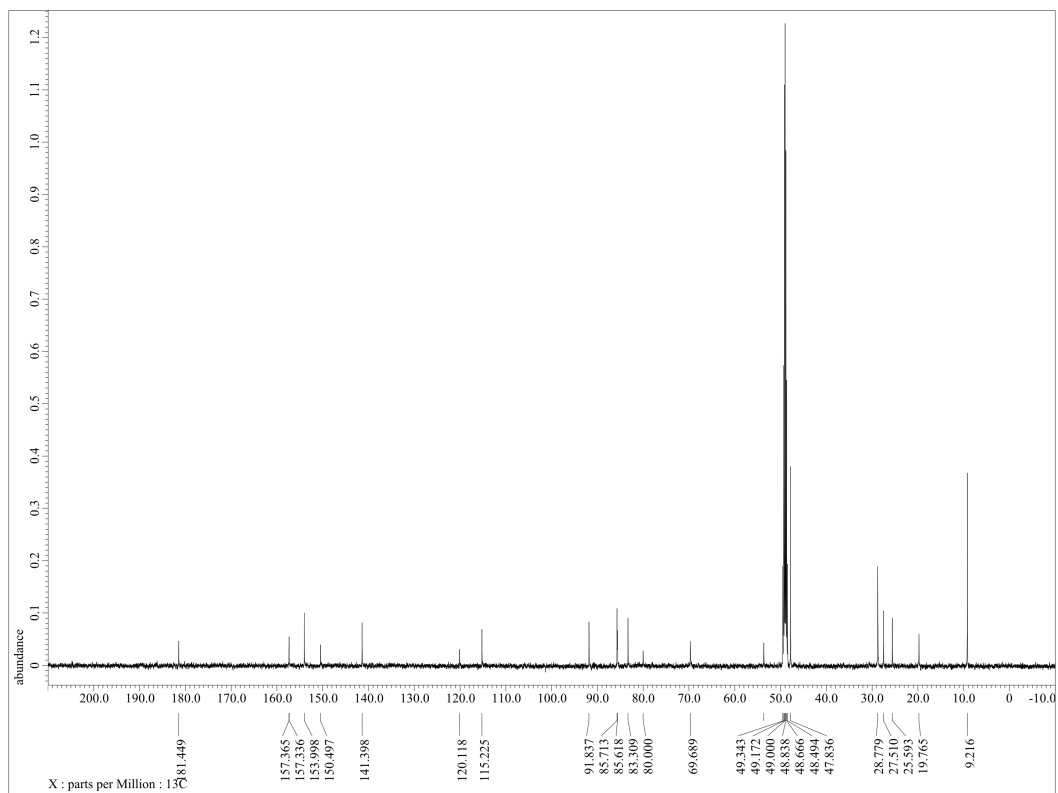
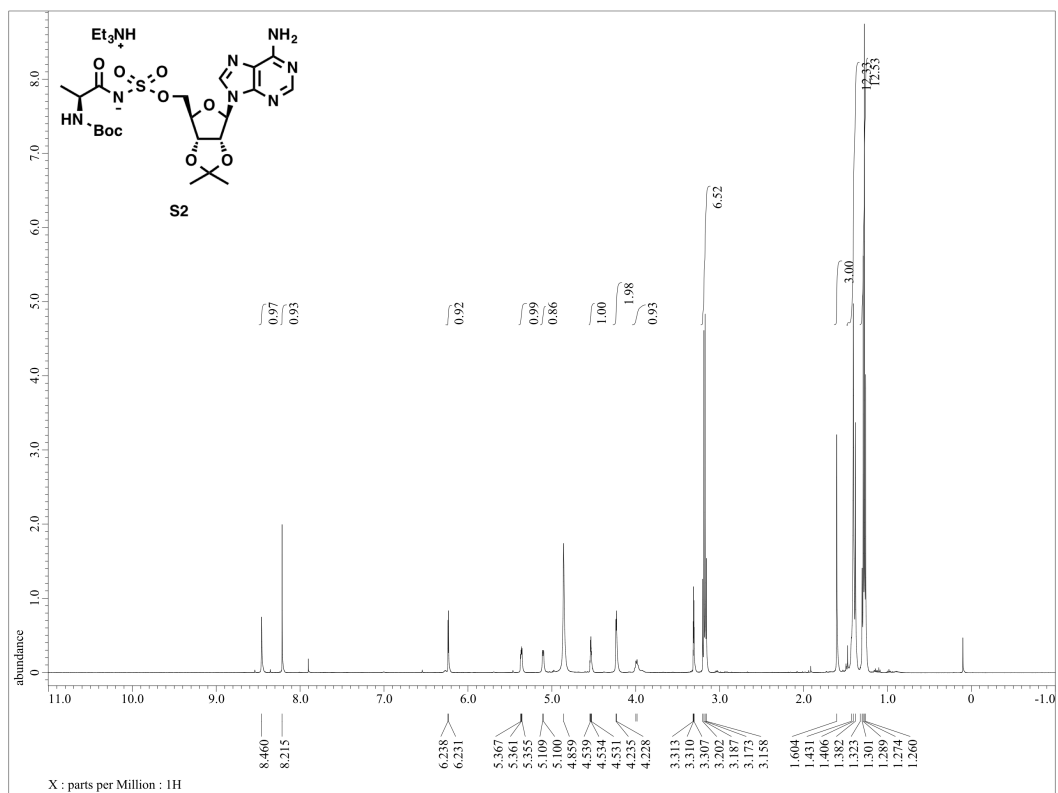
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S1**



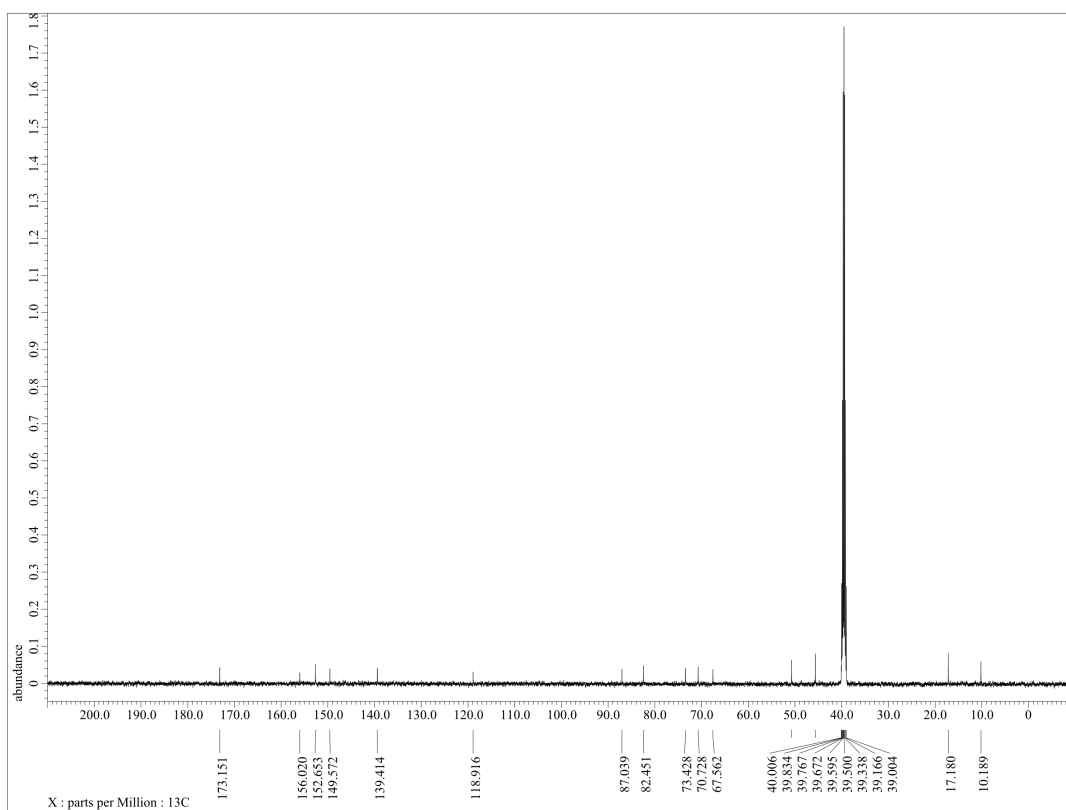
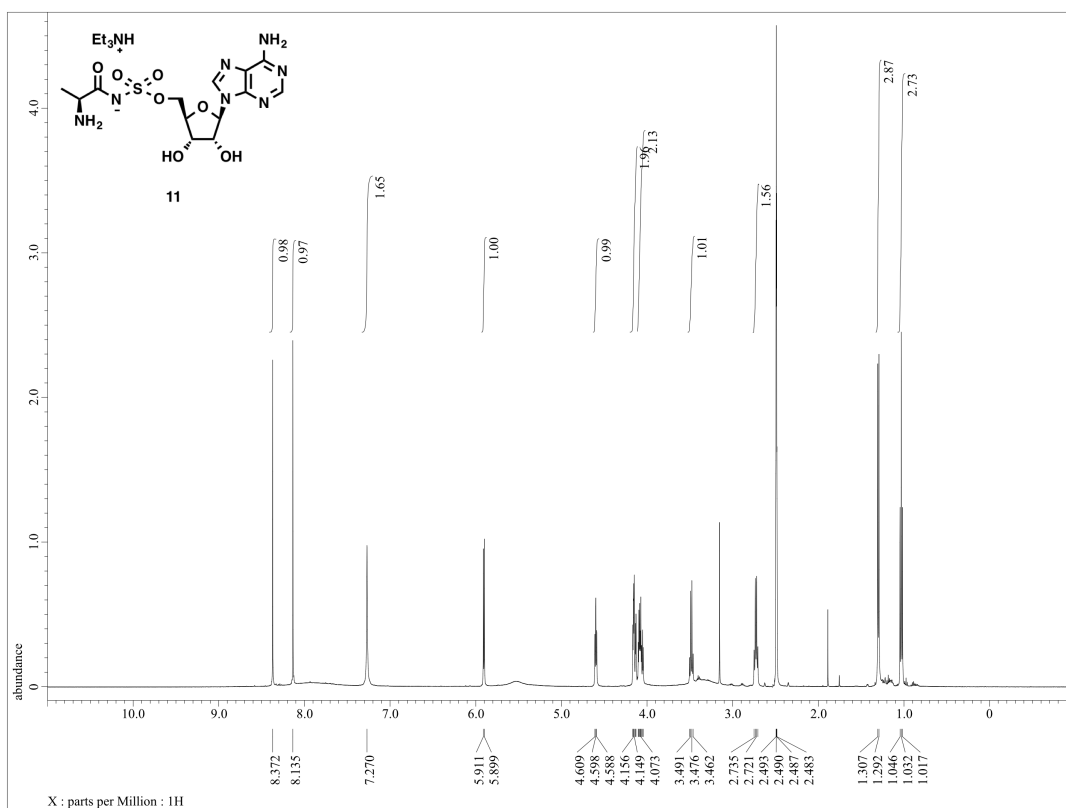
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **10**



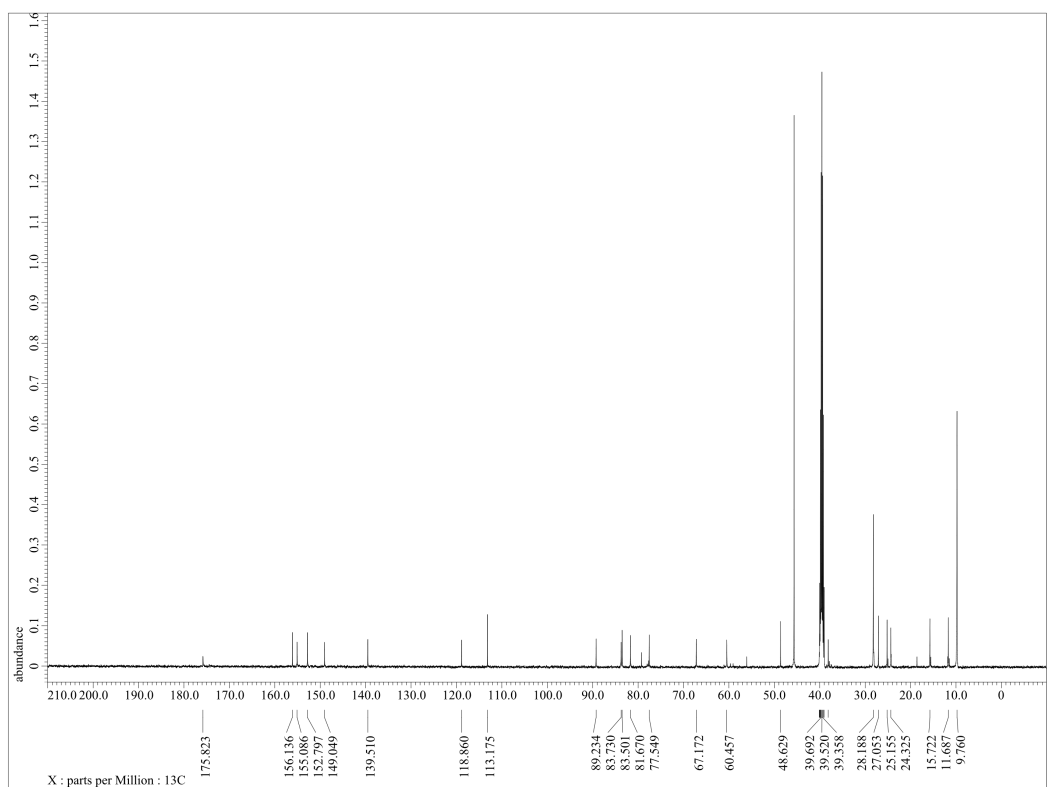
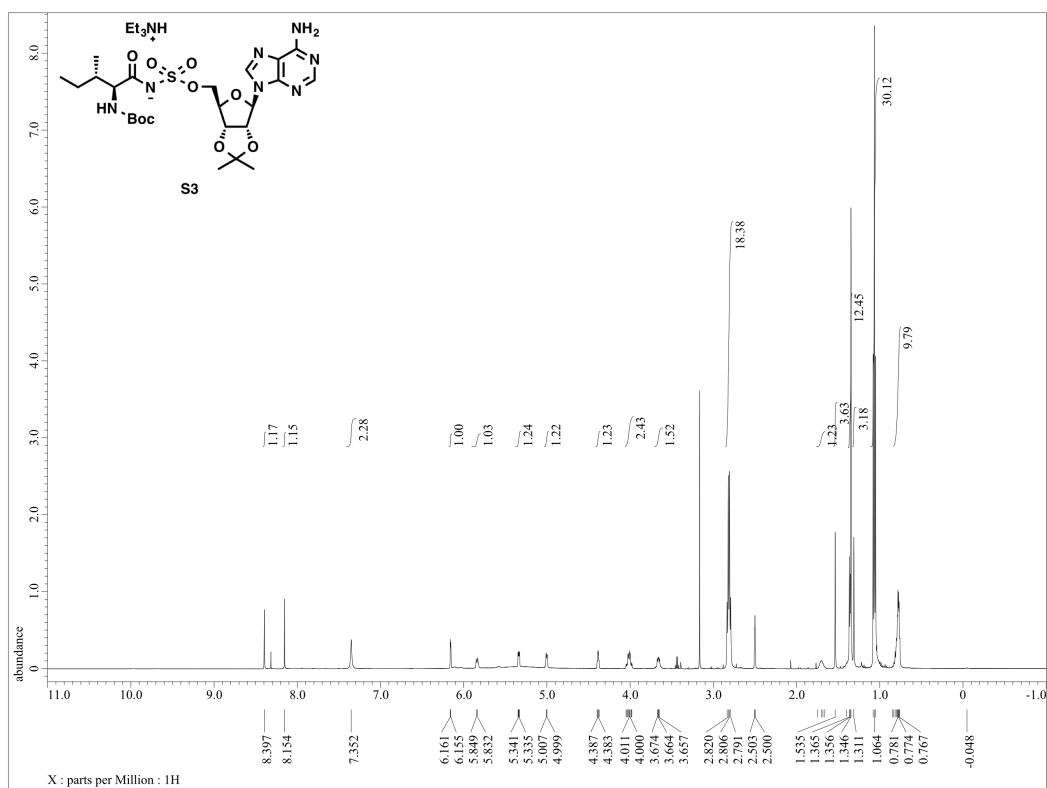
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S2**



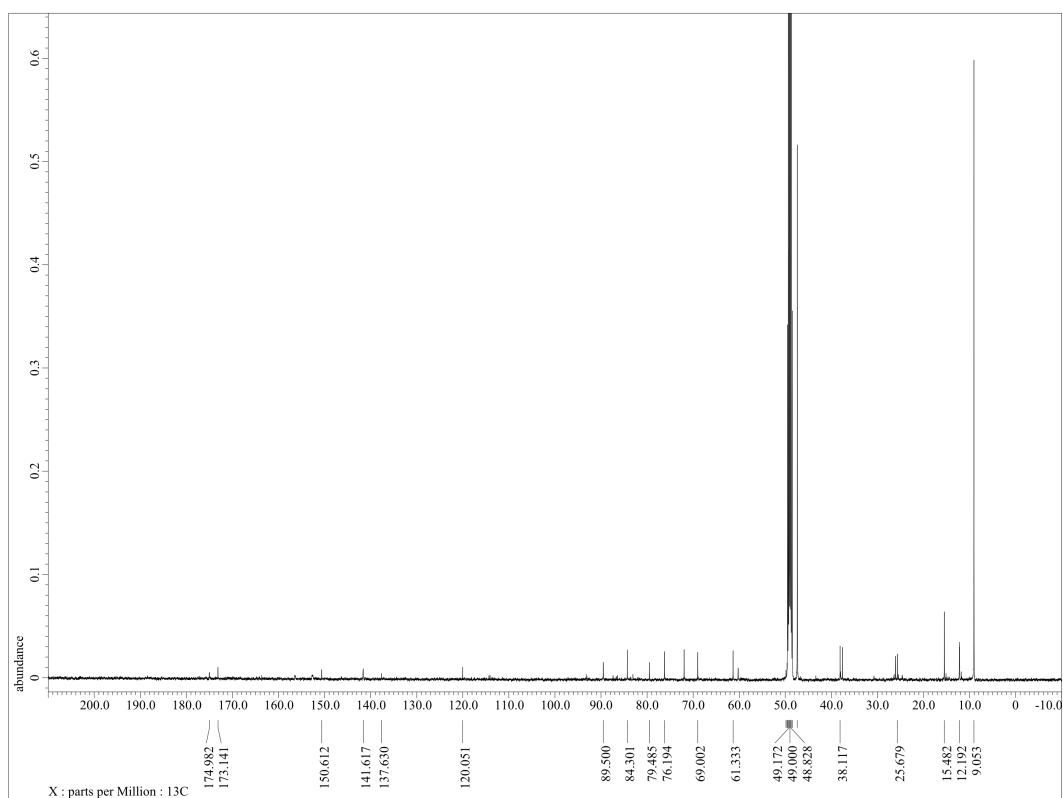
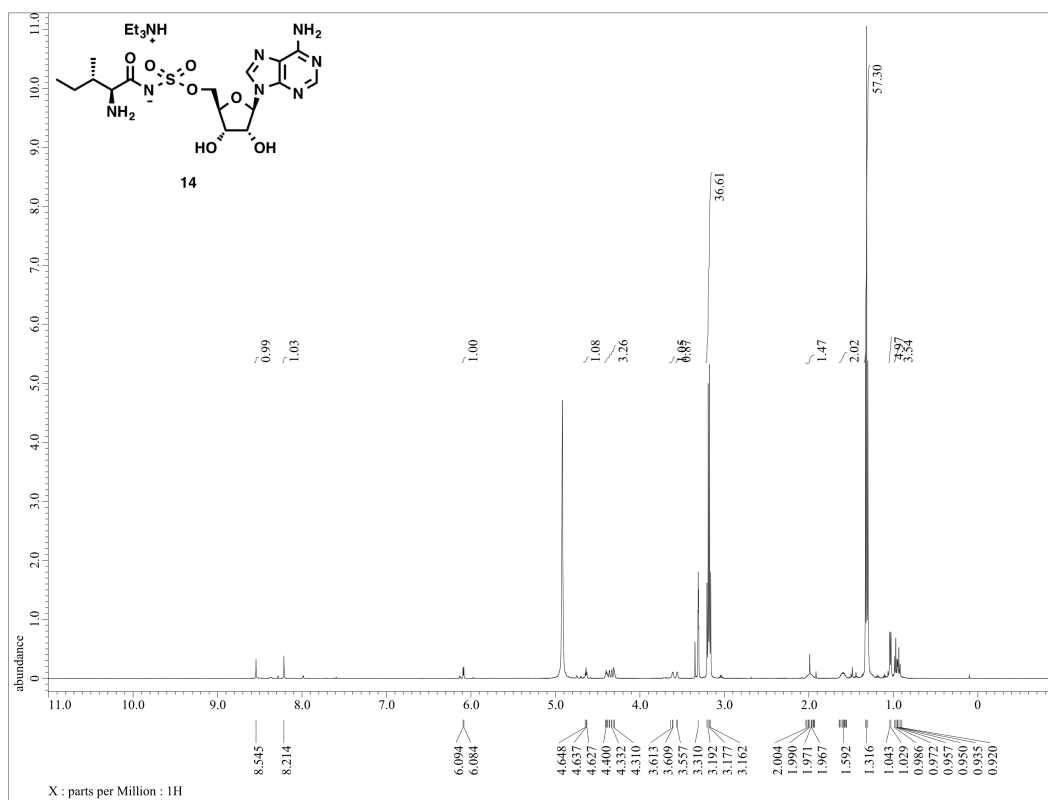
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **11**



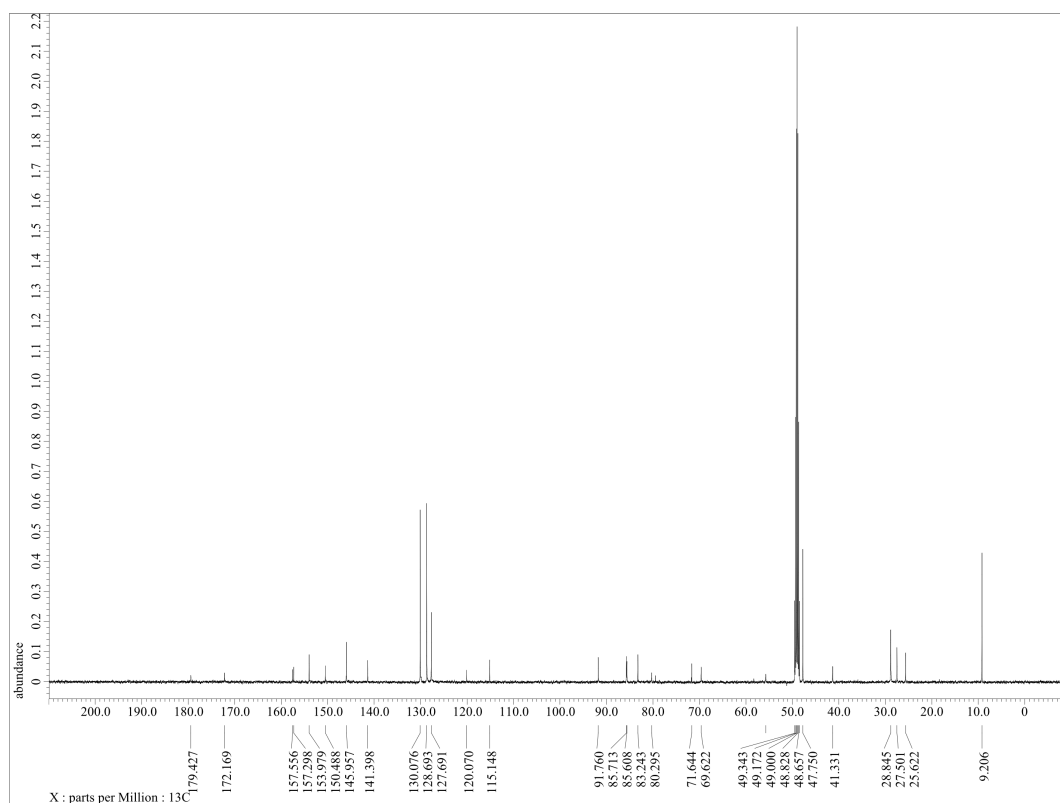
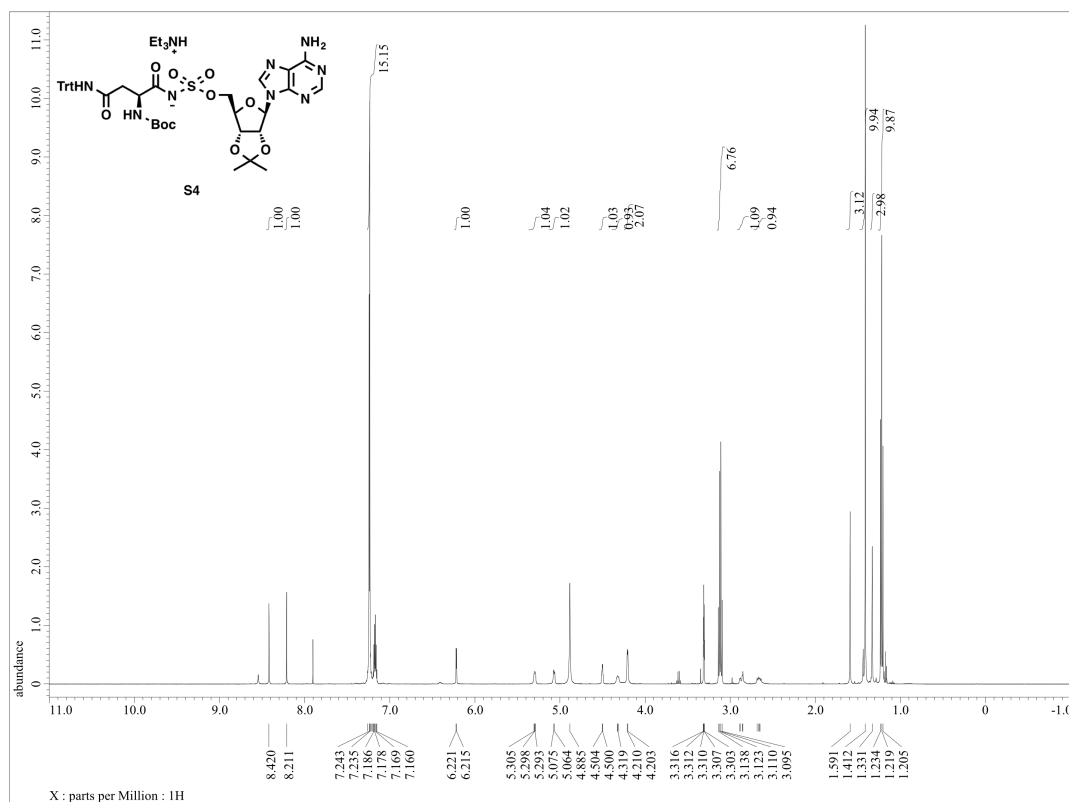
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S3**



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **14**

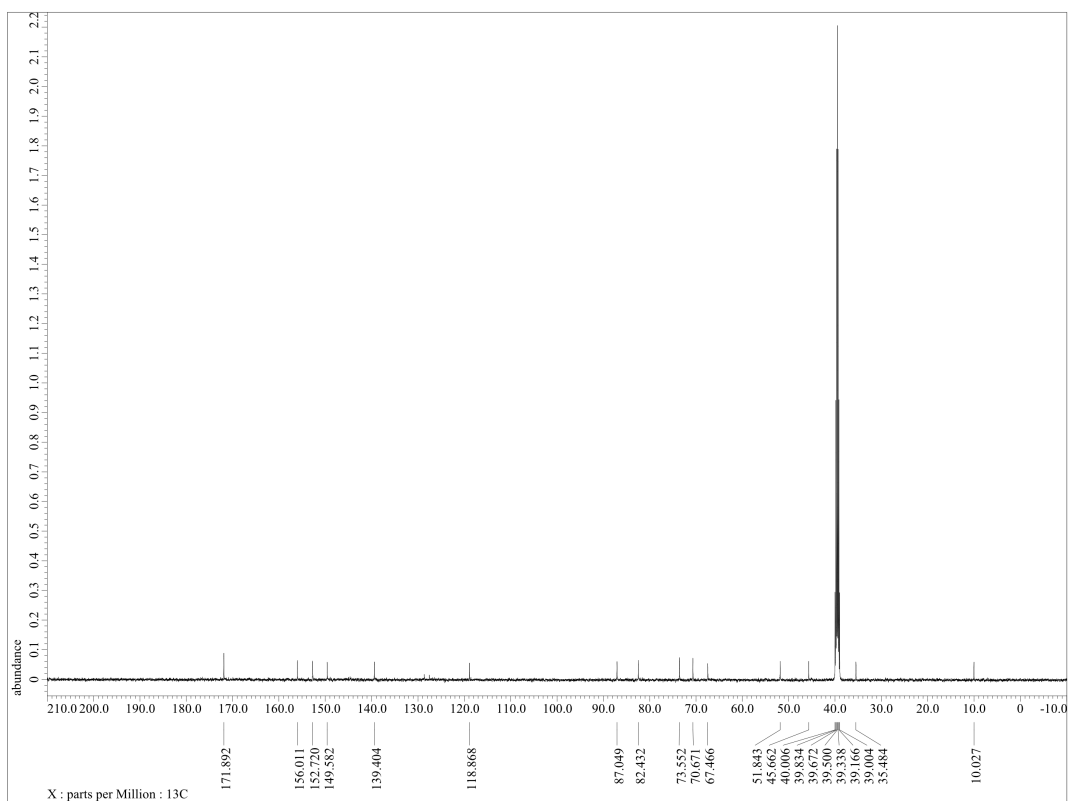
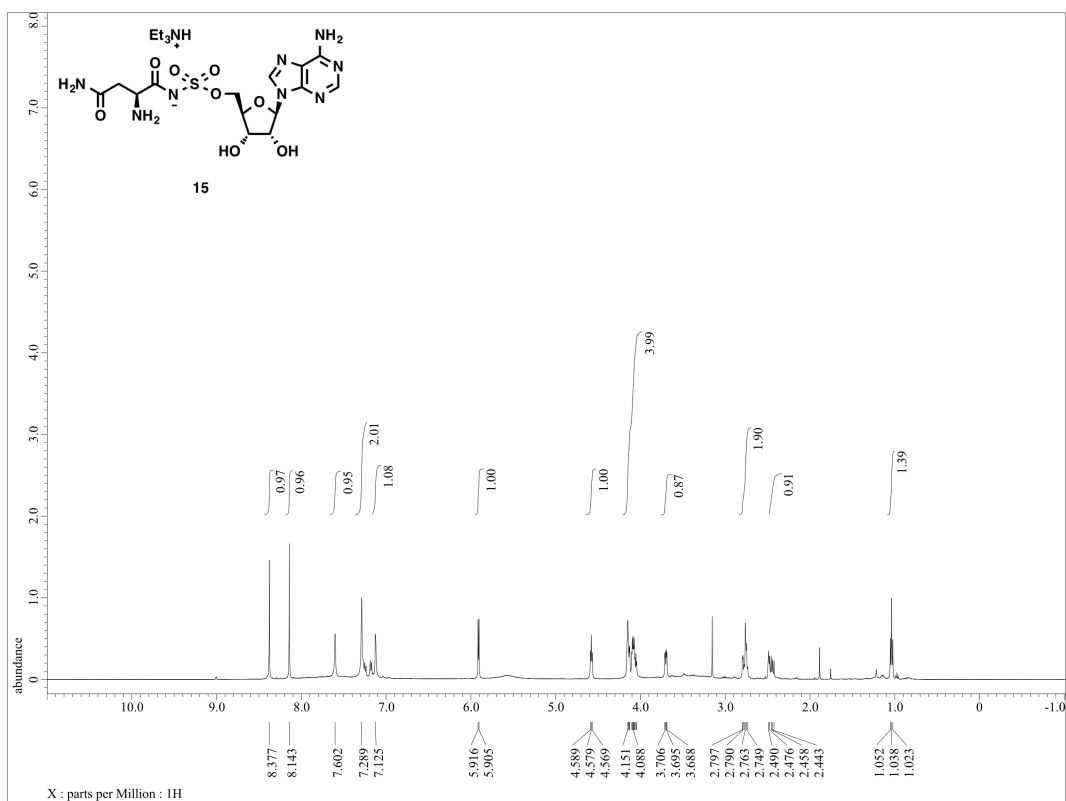


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S4**

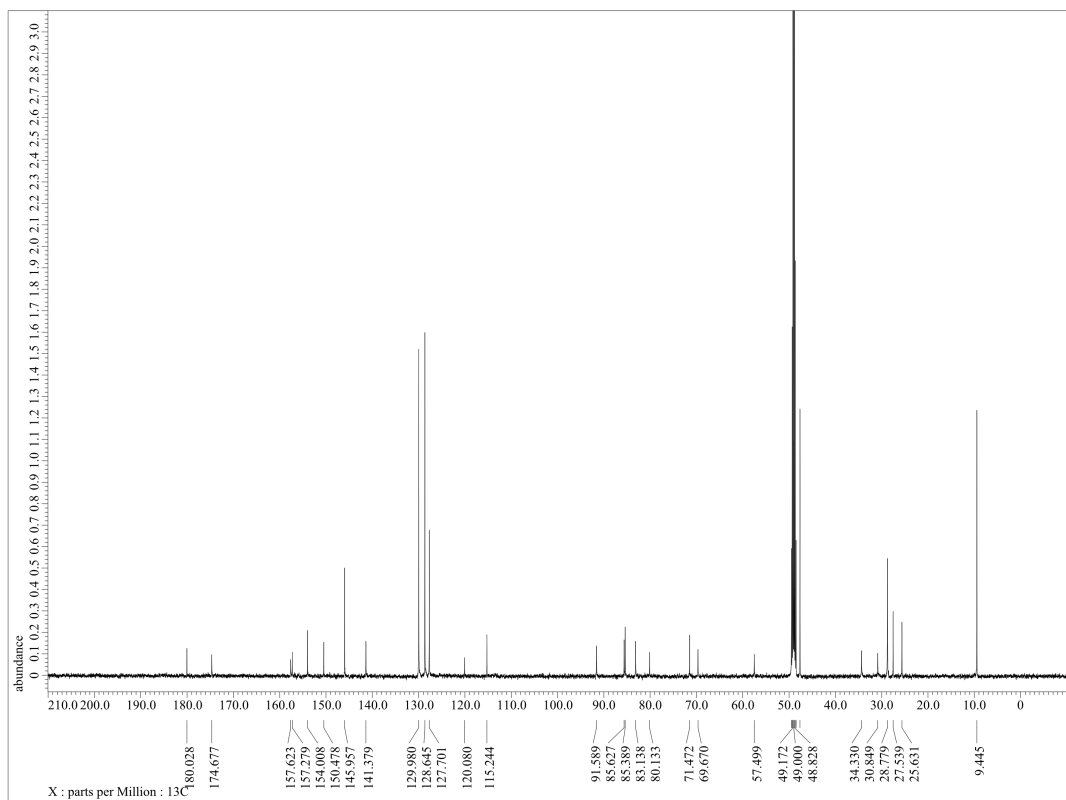
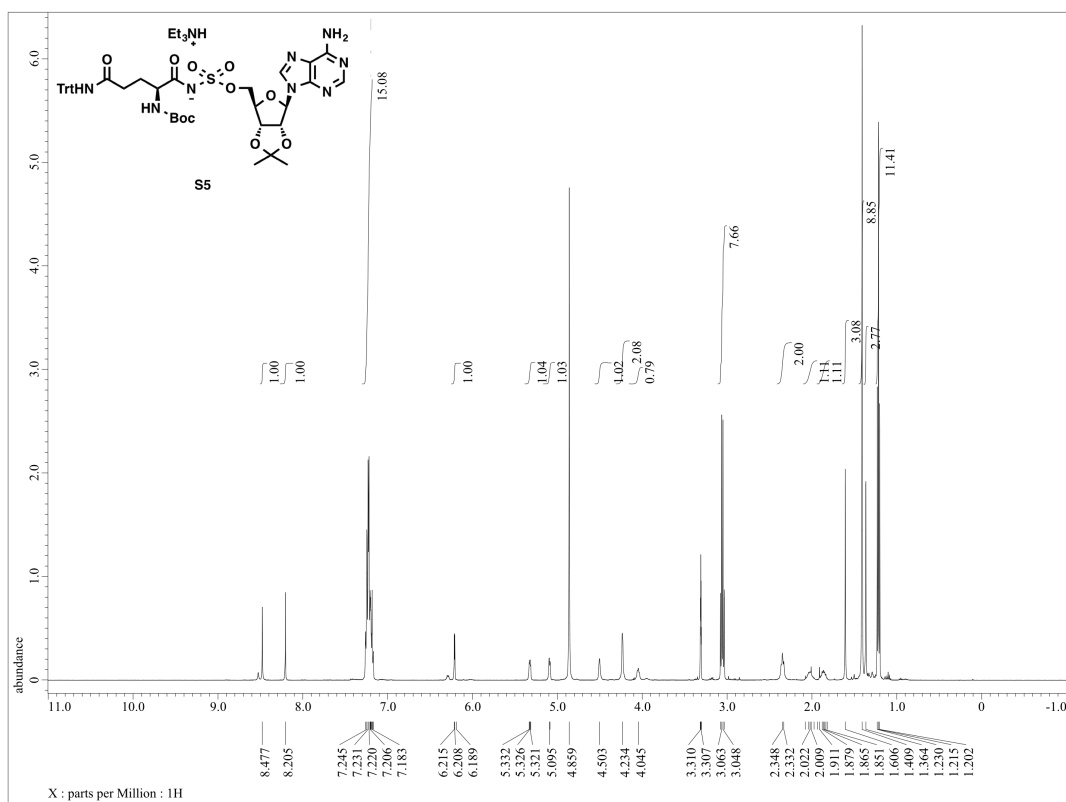




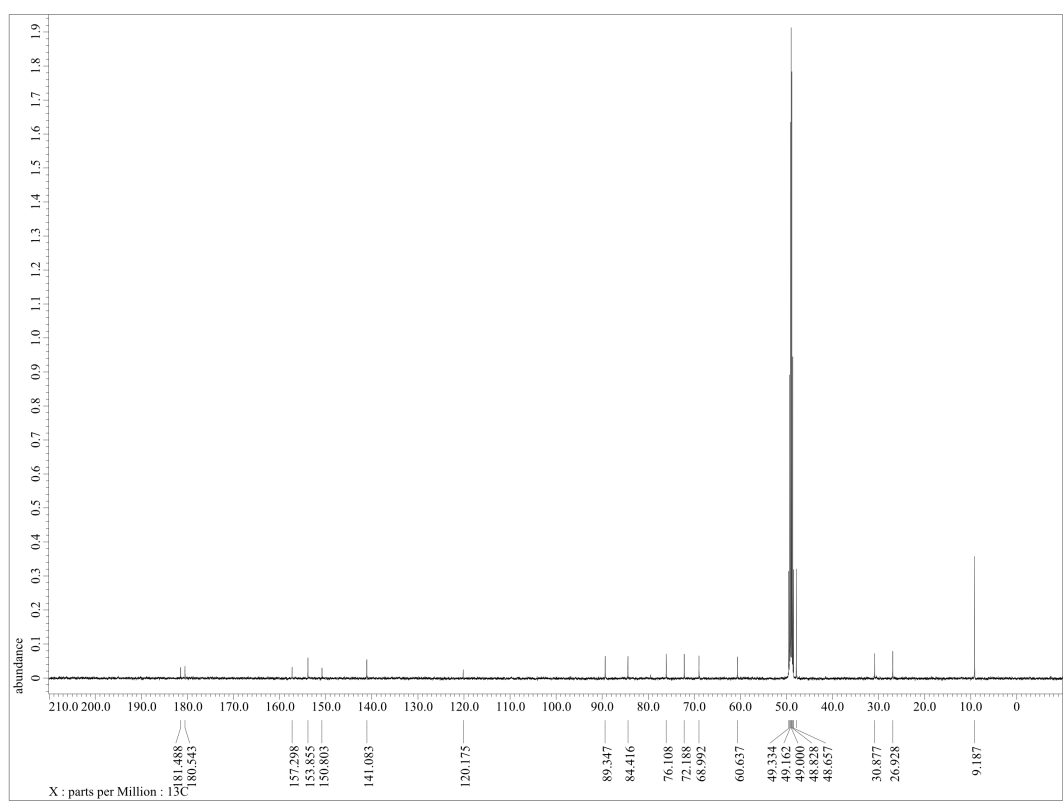
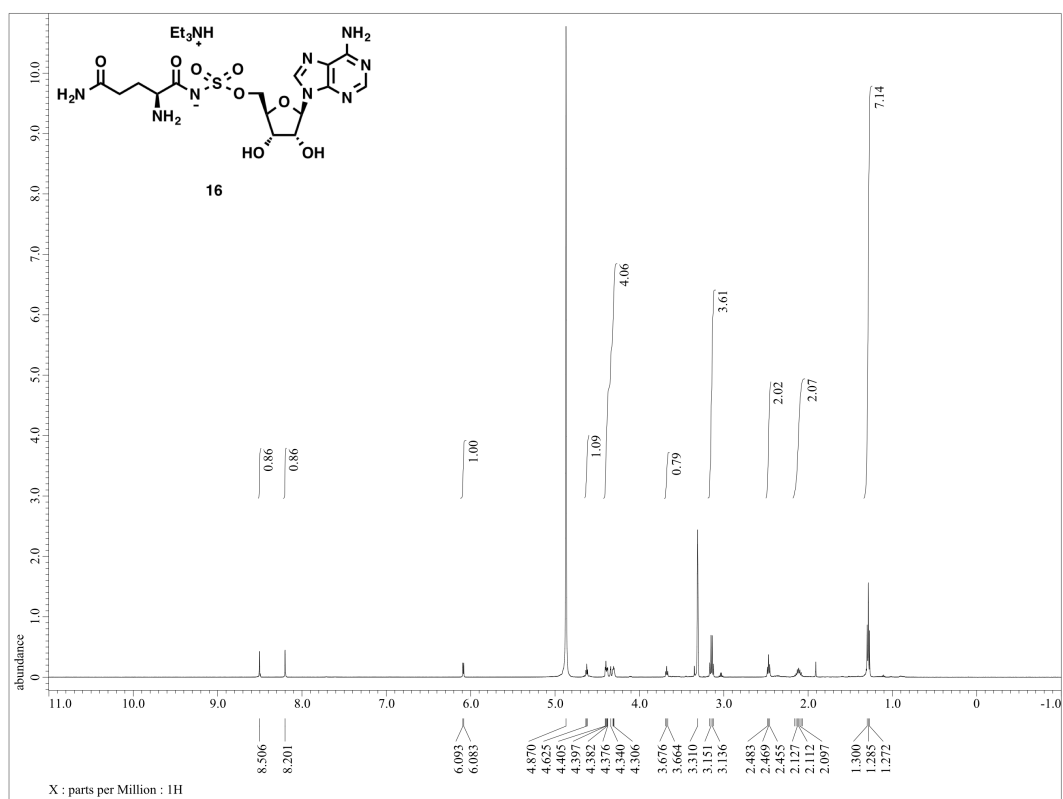
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) spectra of **15**



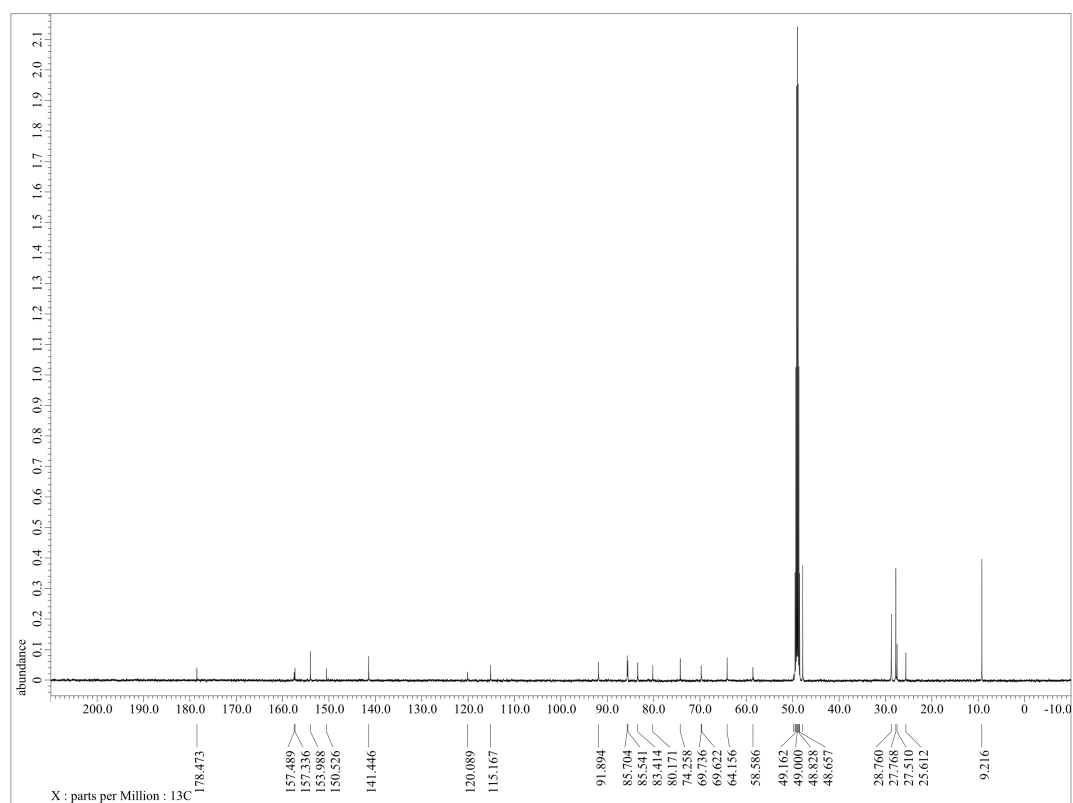
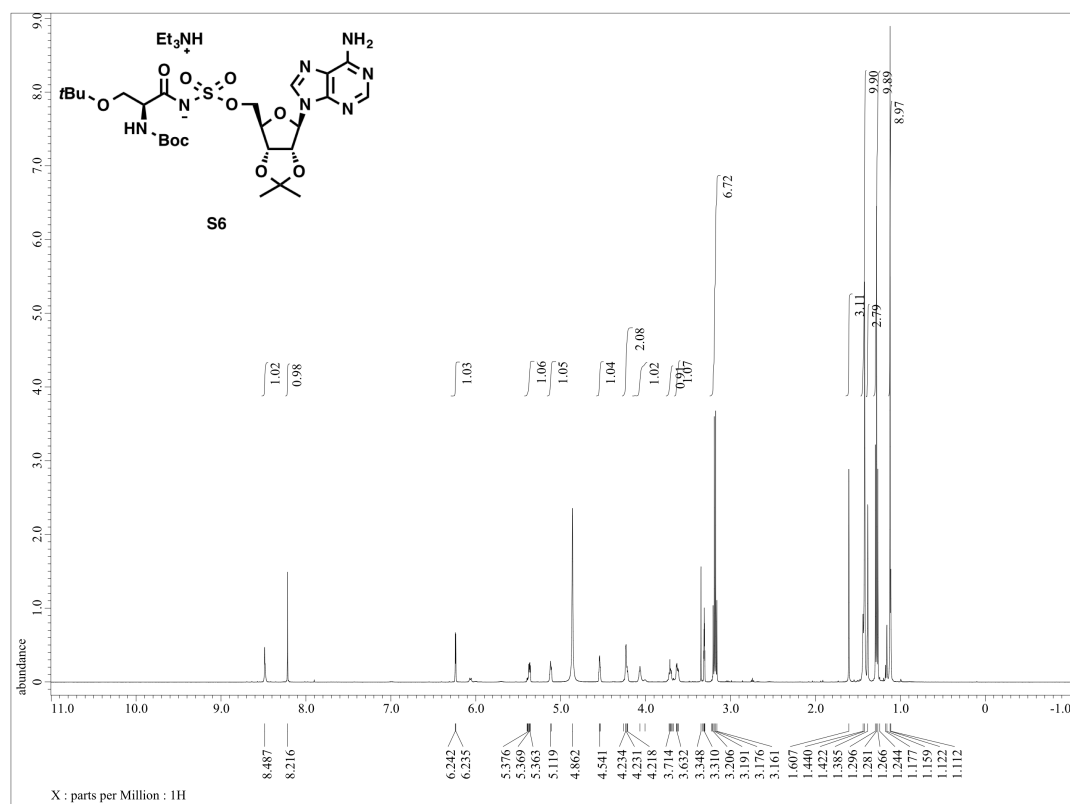
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S5**



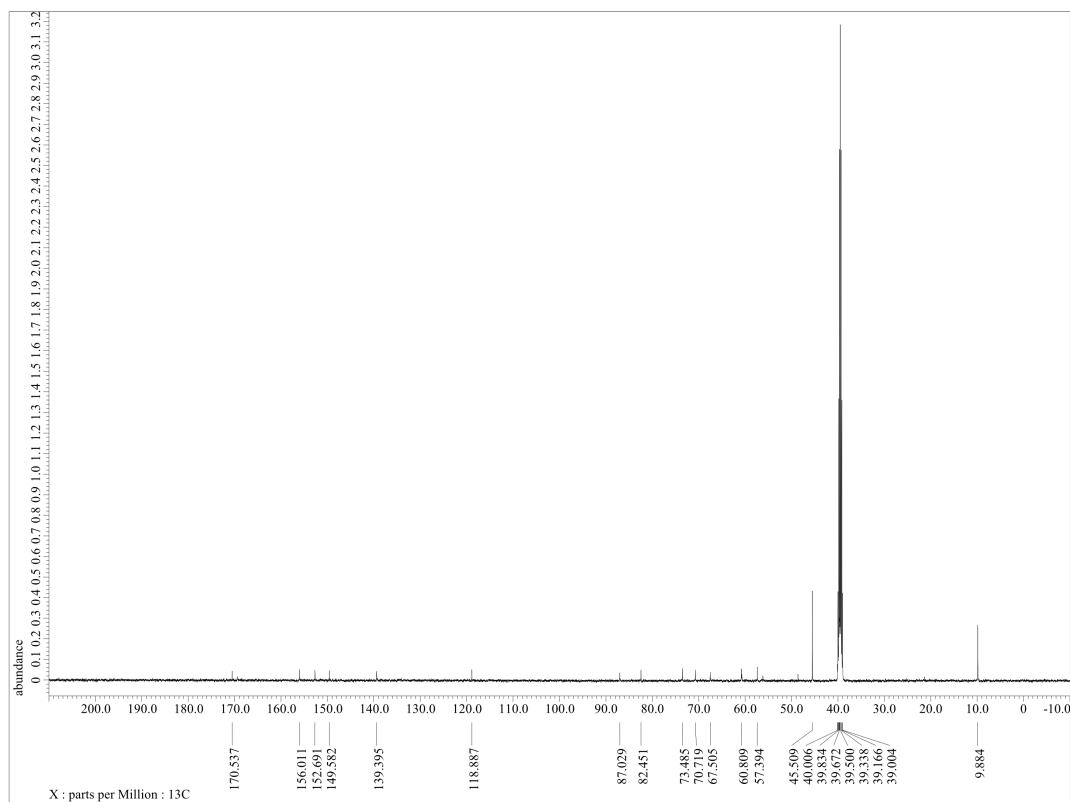
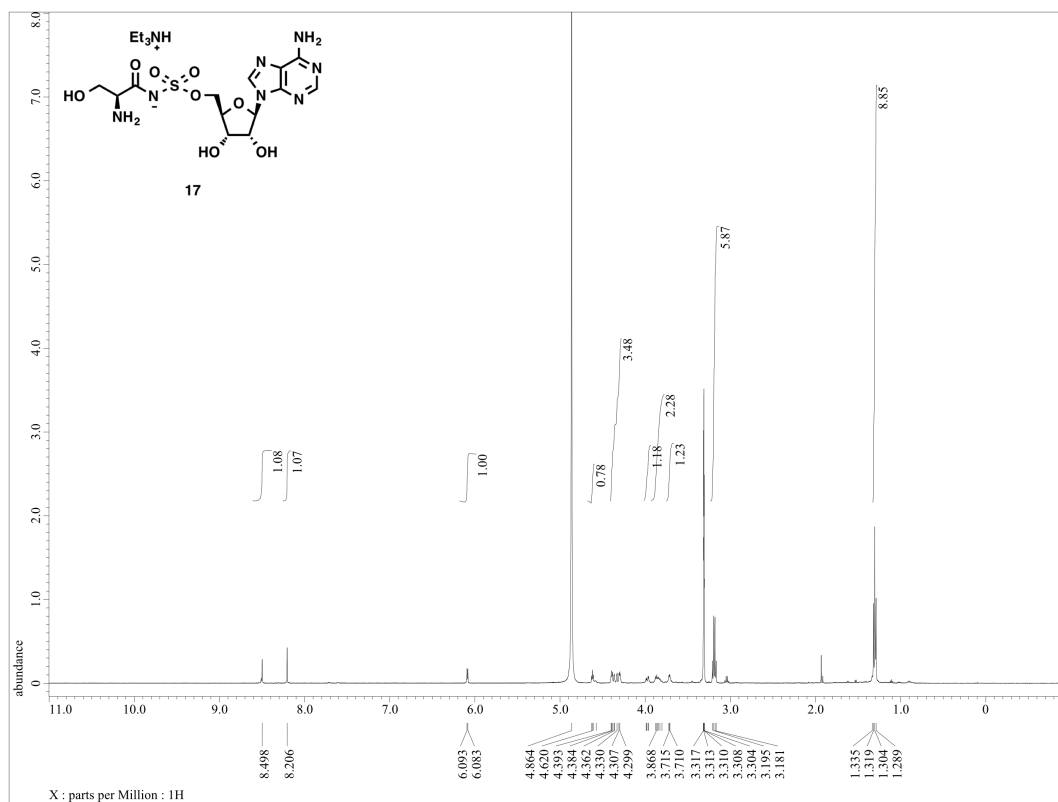
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **16**



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S6**

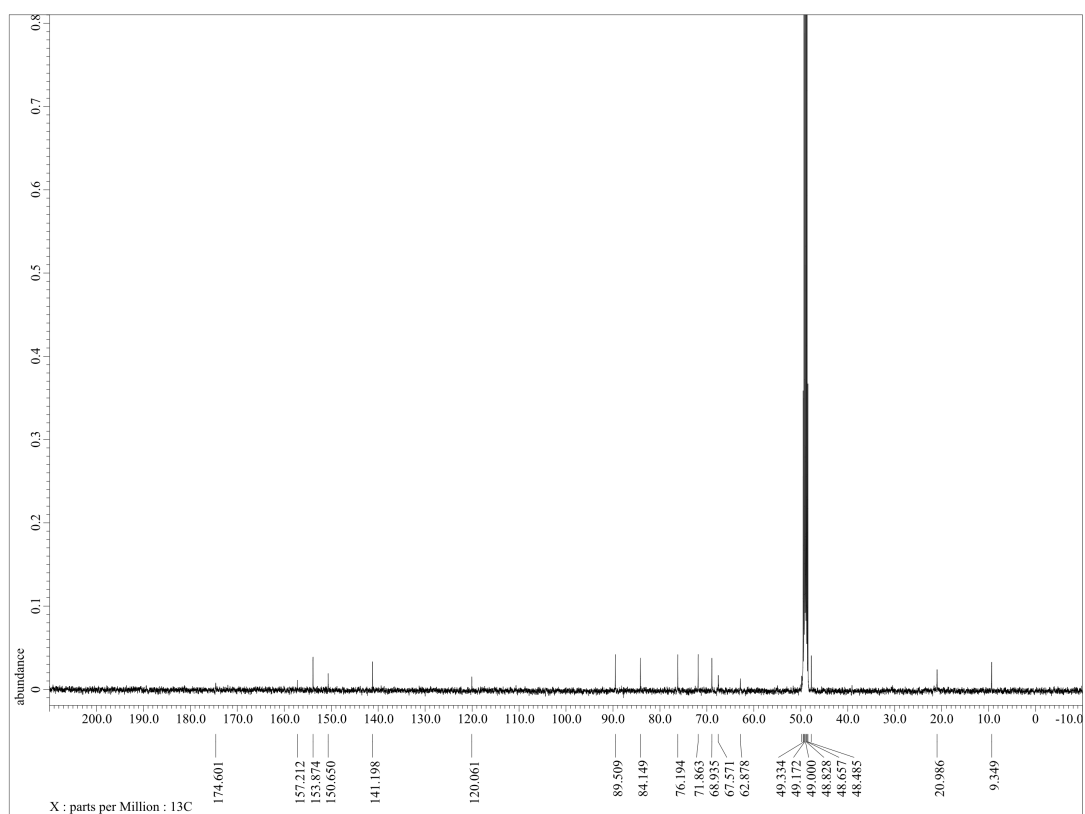
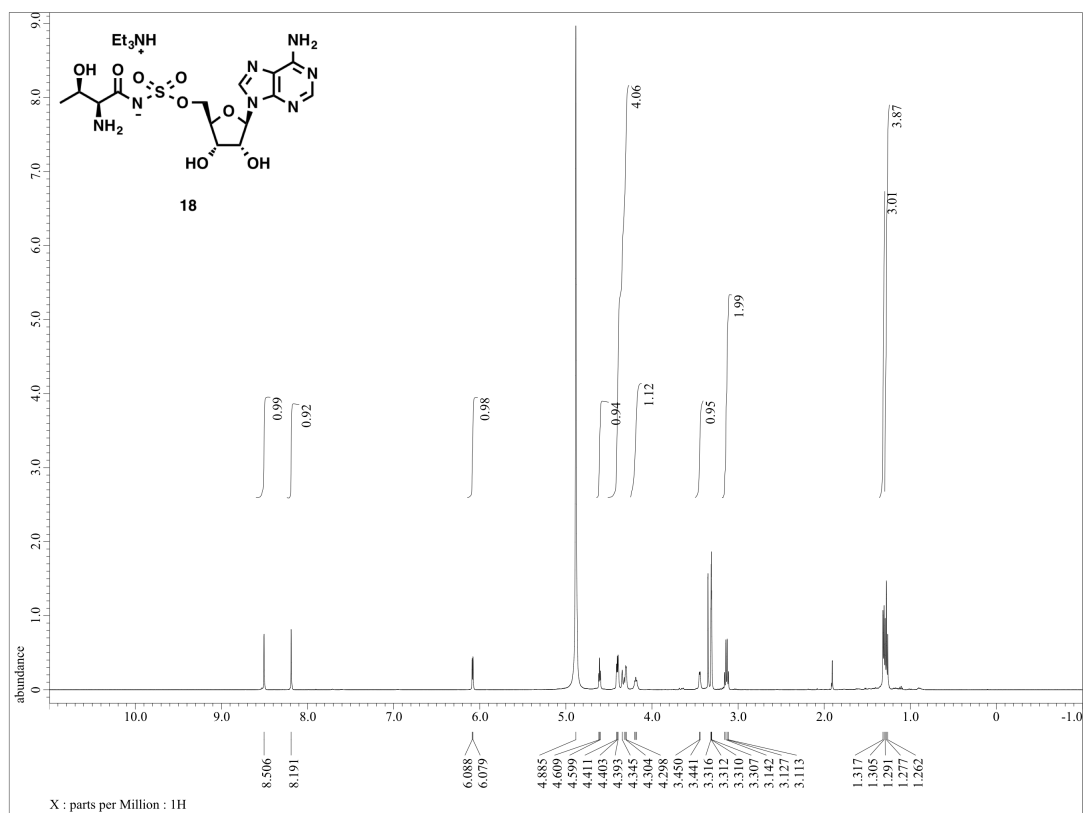


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **17**

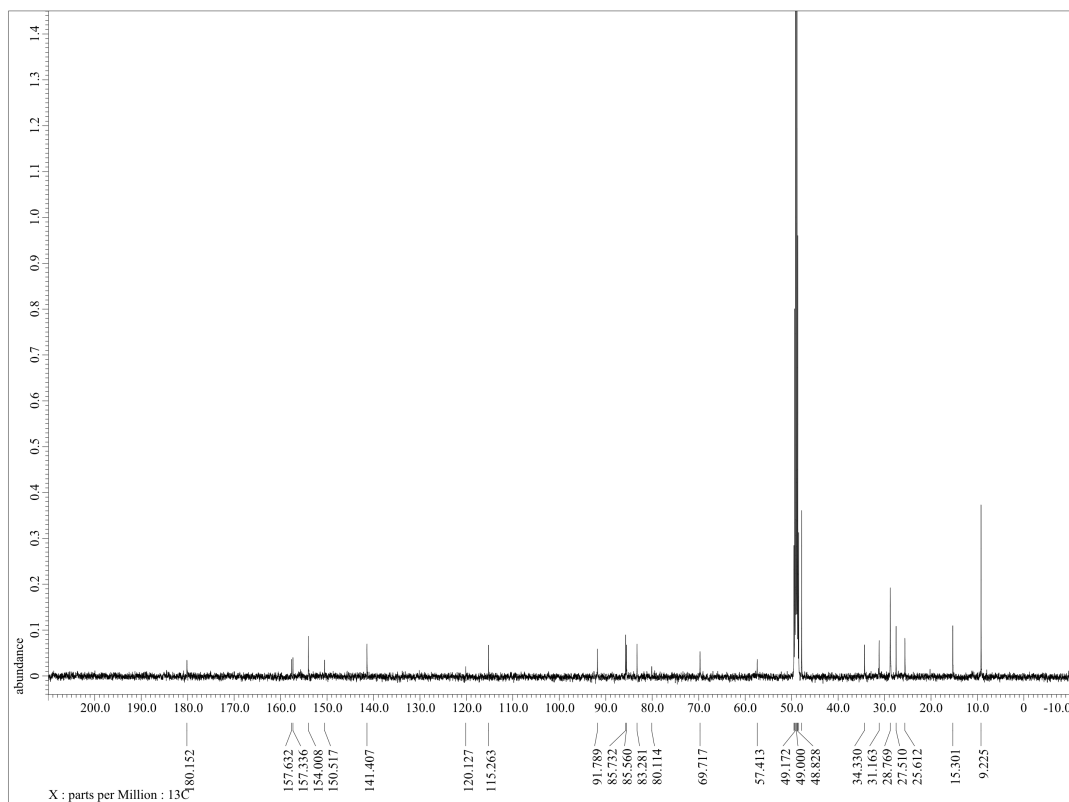
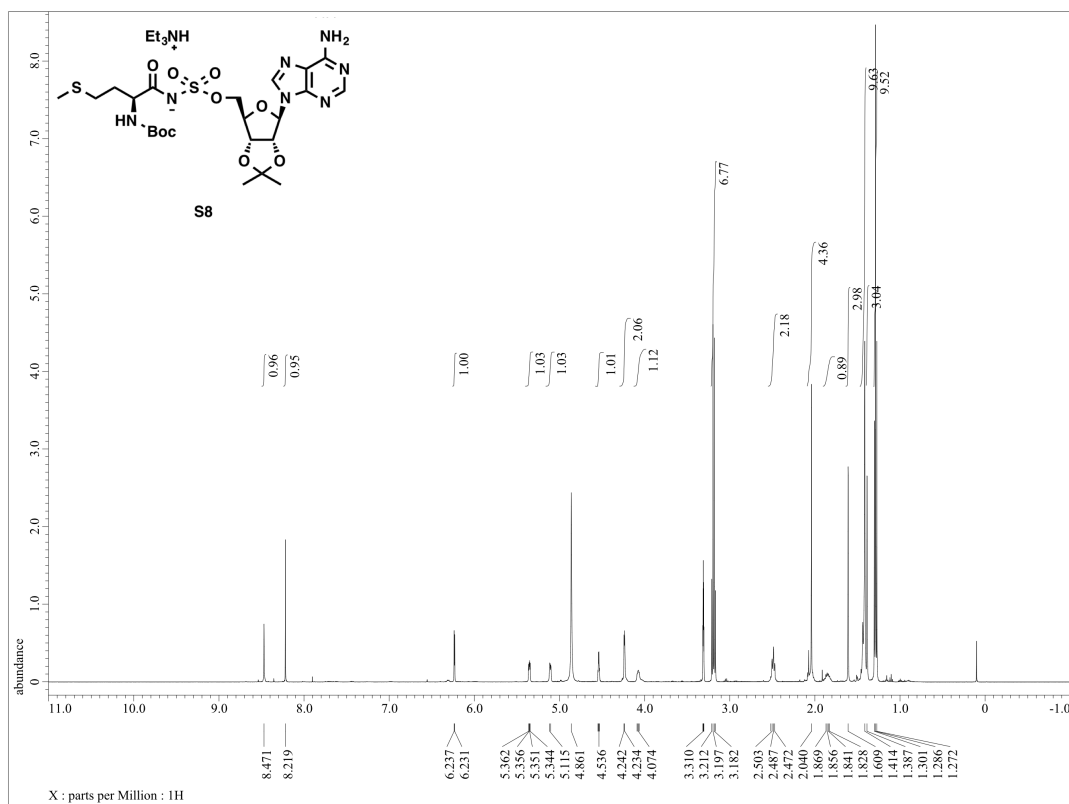




$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **18**

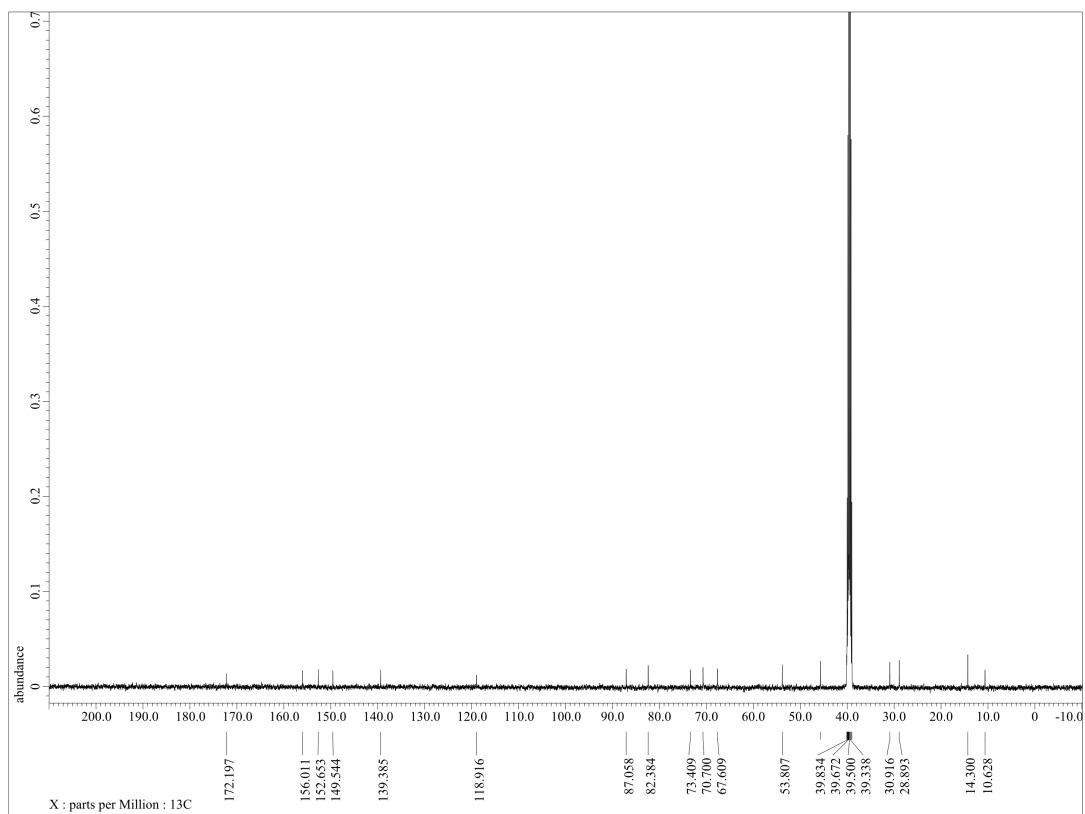
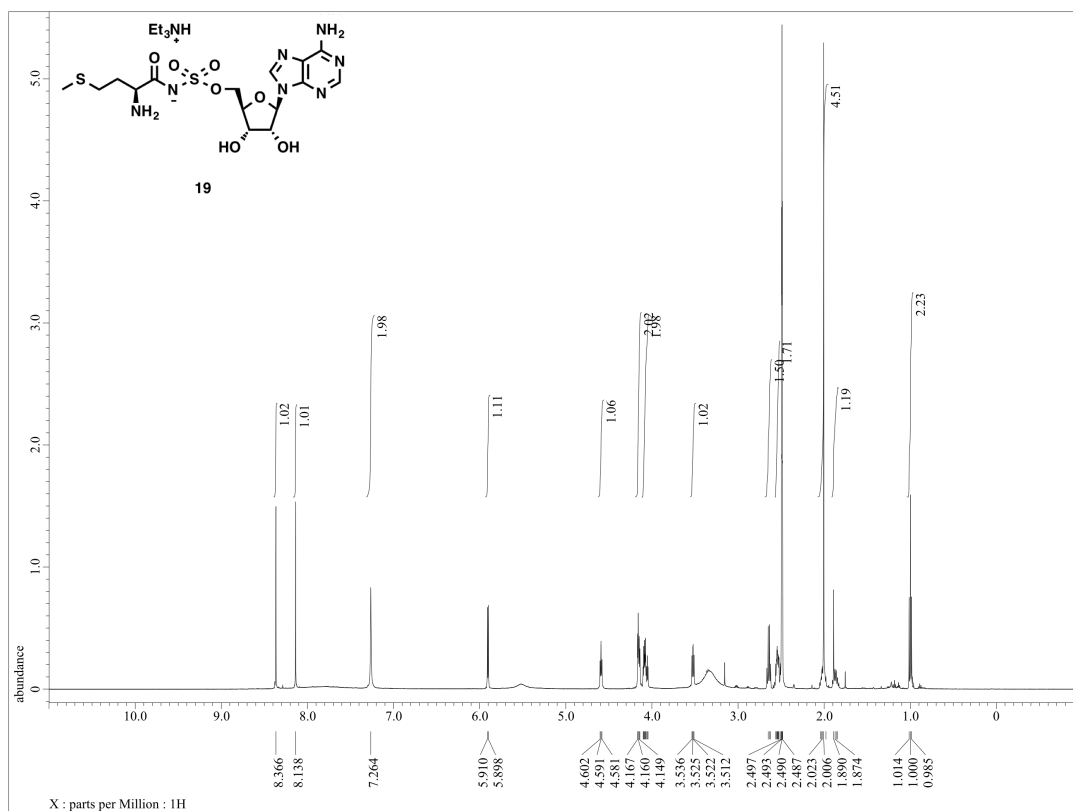


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S8**

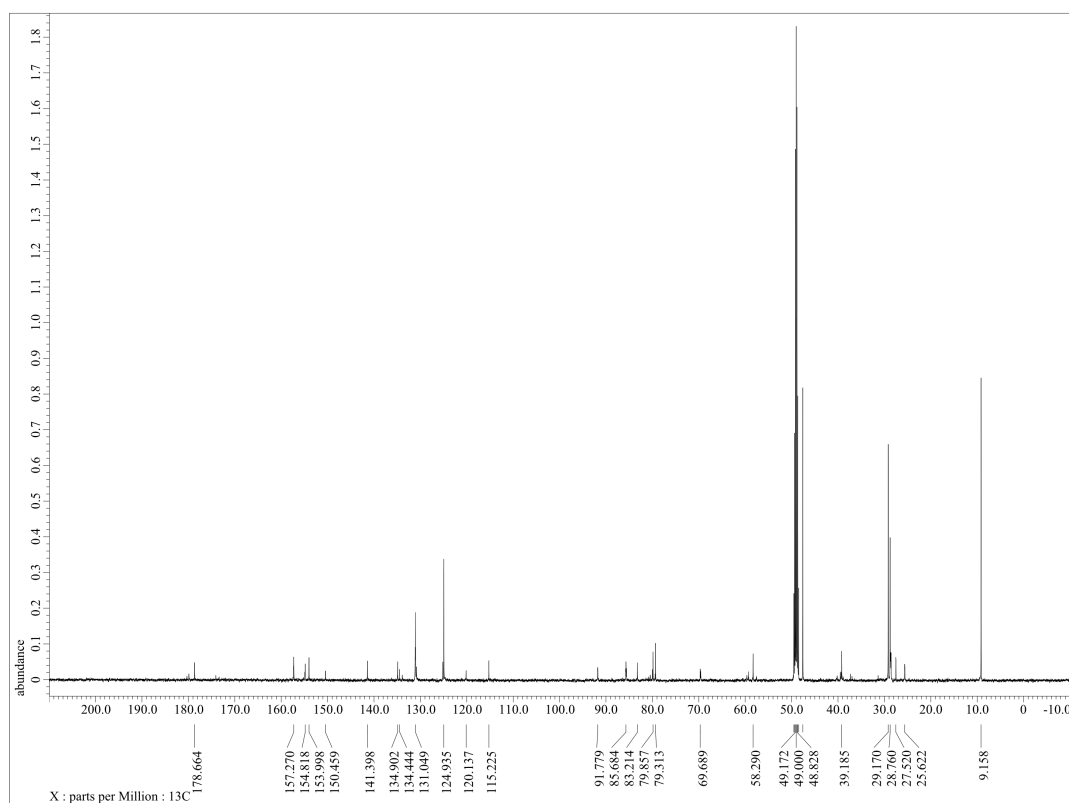
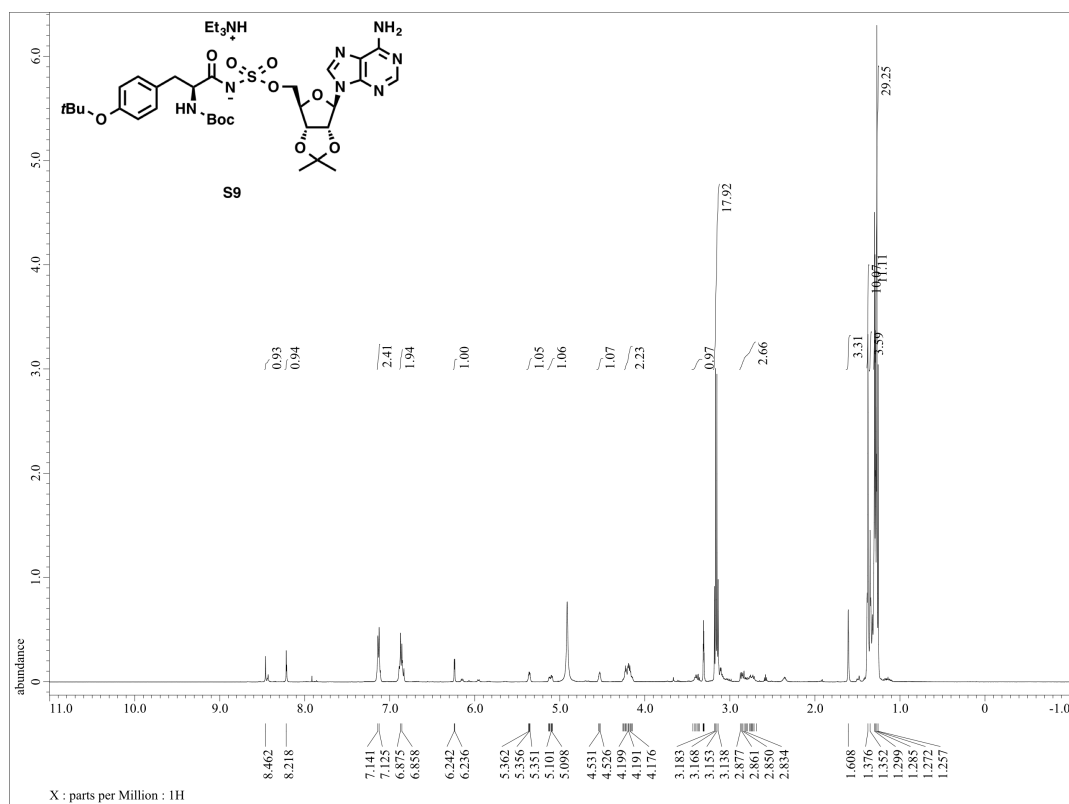




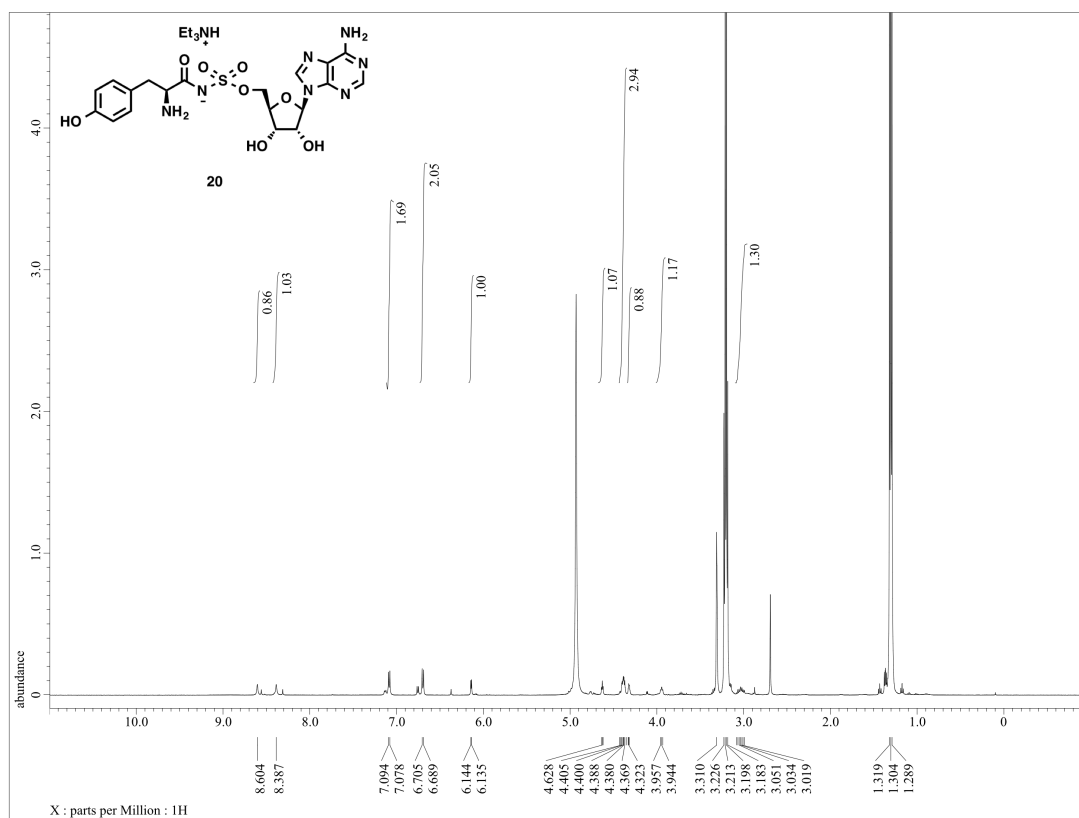
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) spectra of **19**



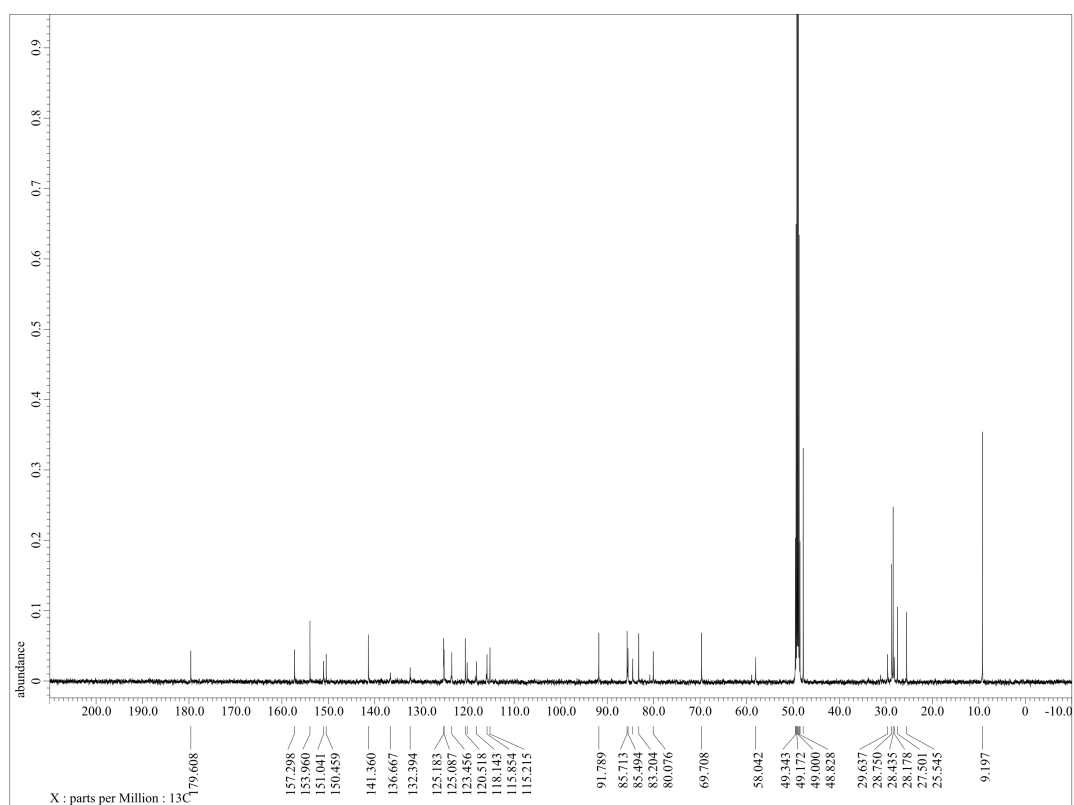
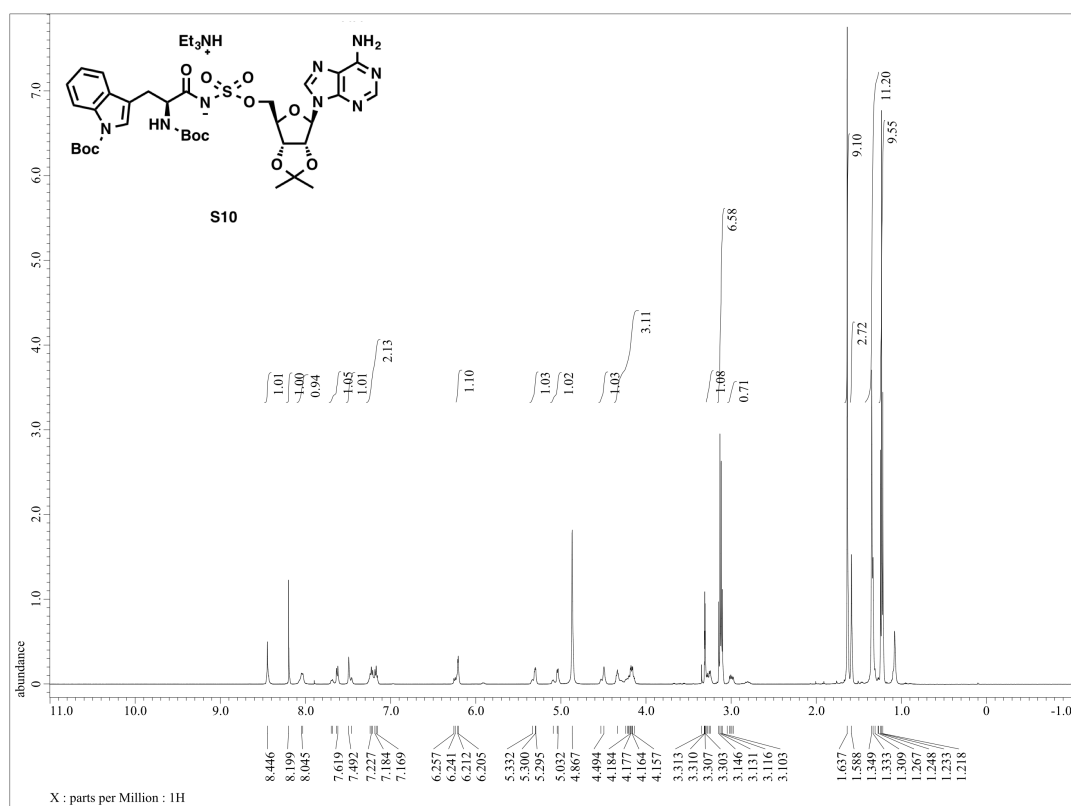
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S9**



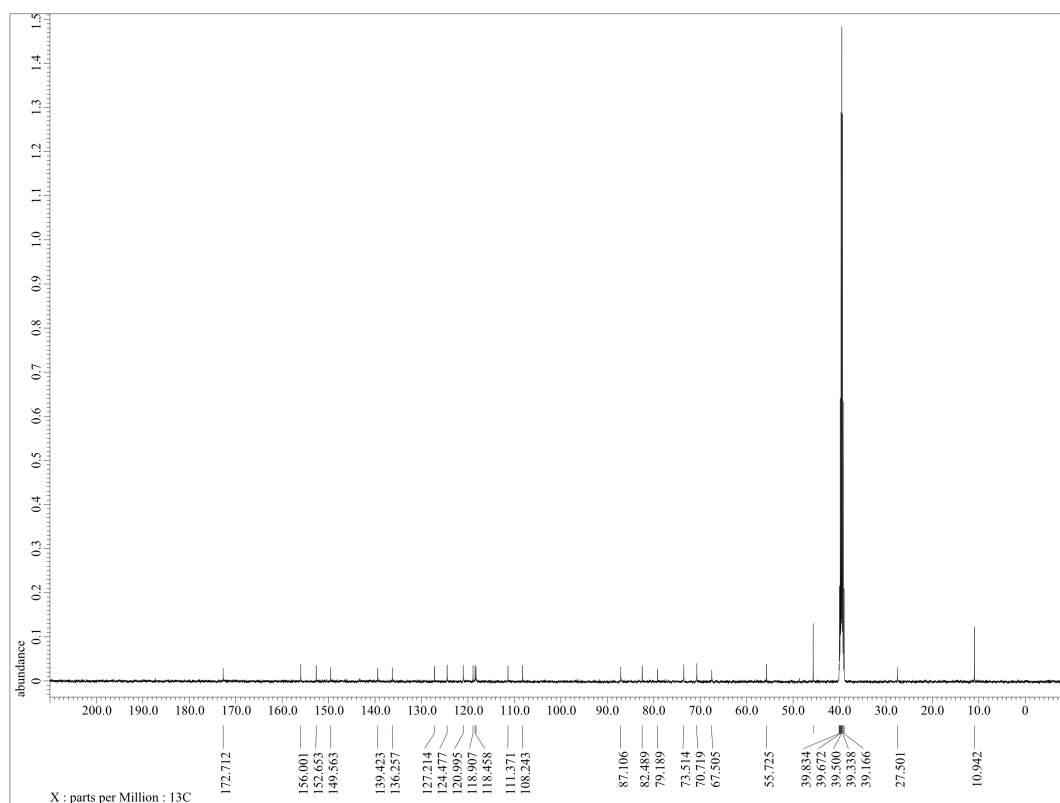
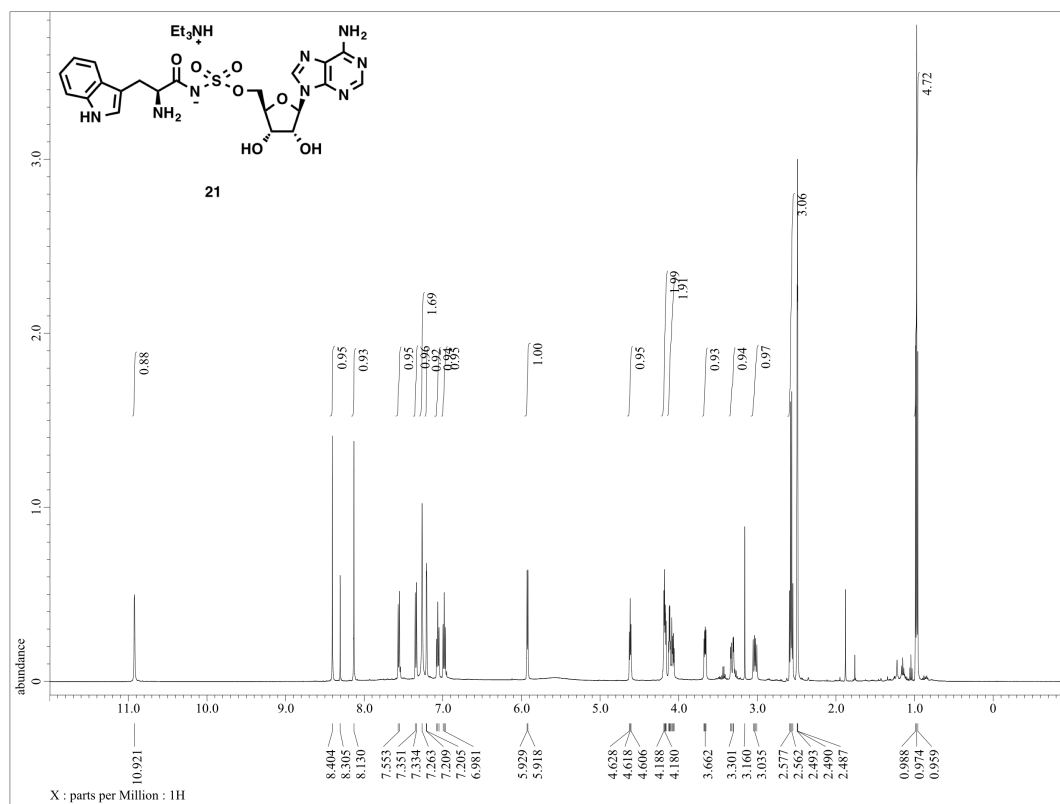
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) spectrum of **20**



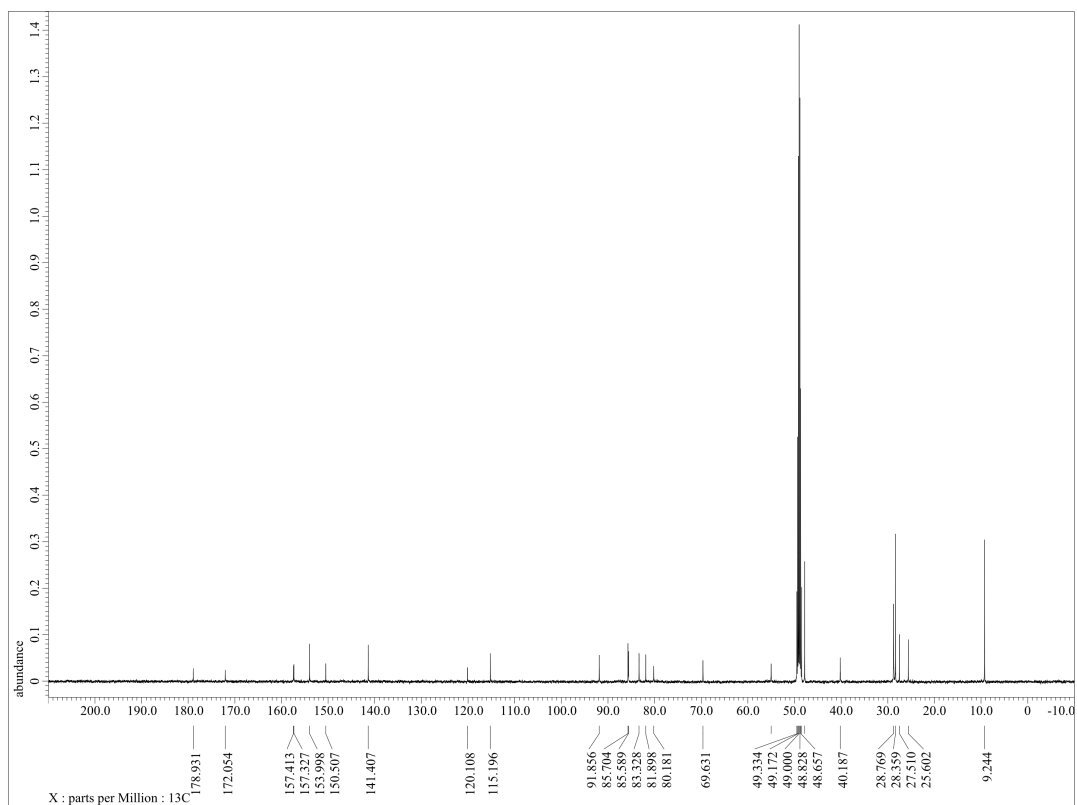
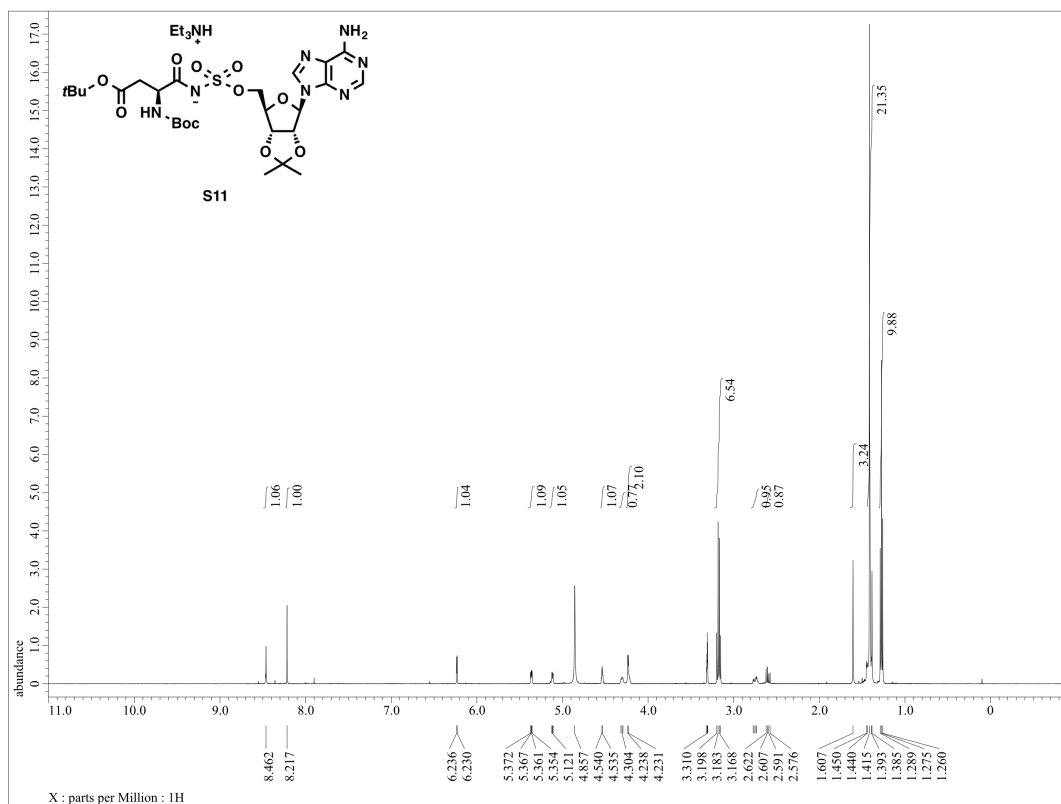
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S10**



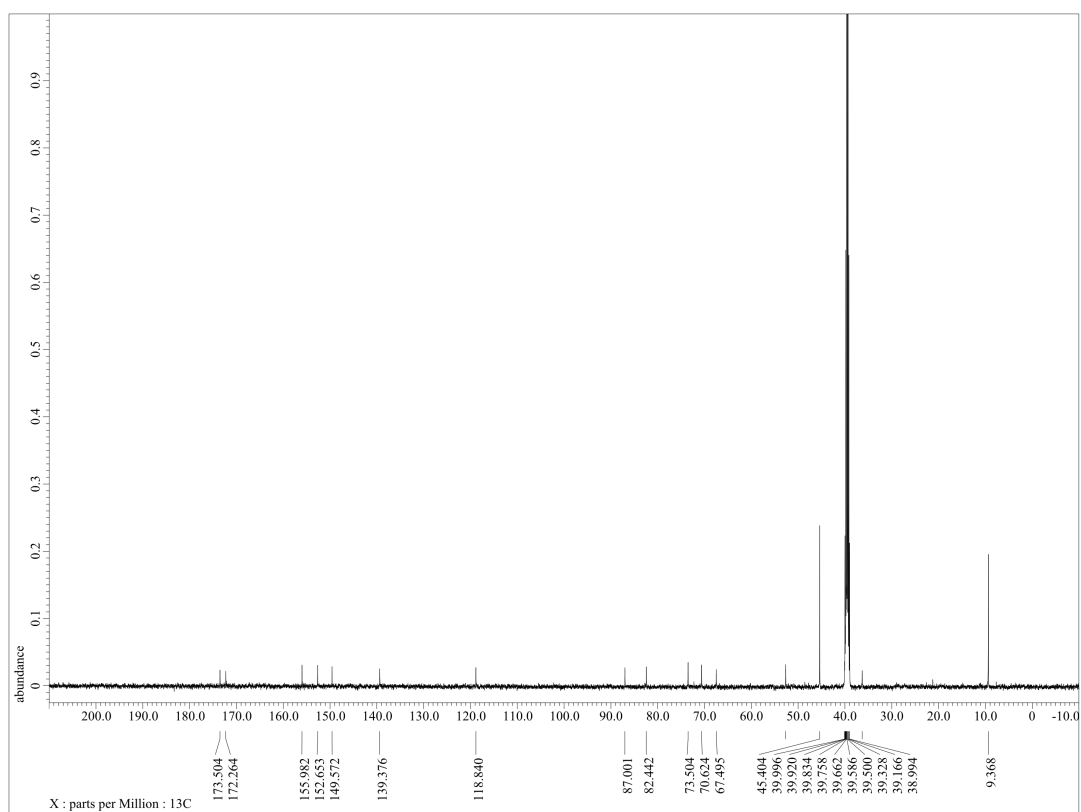
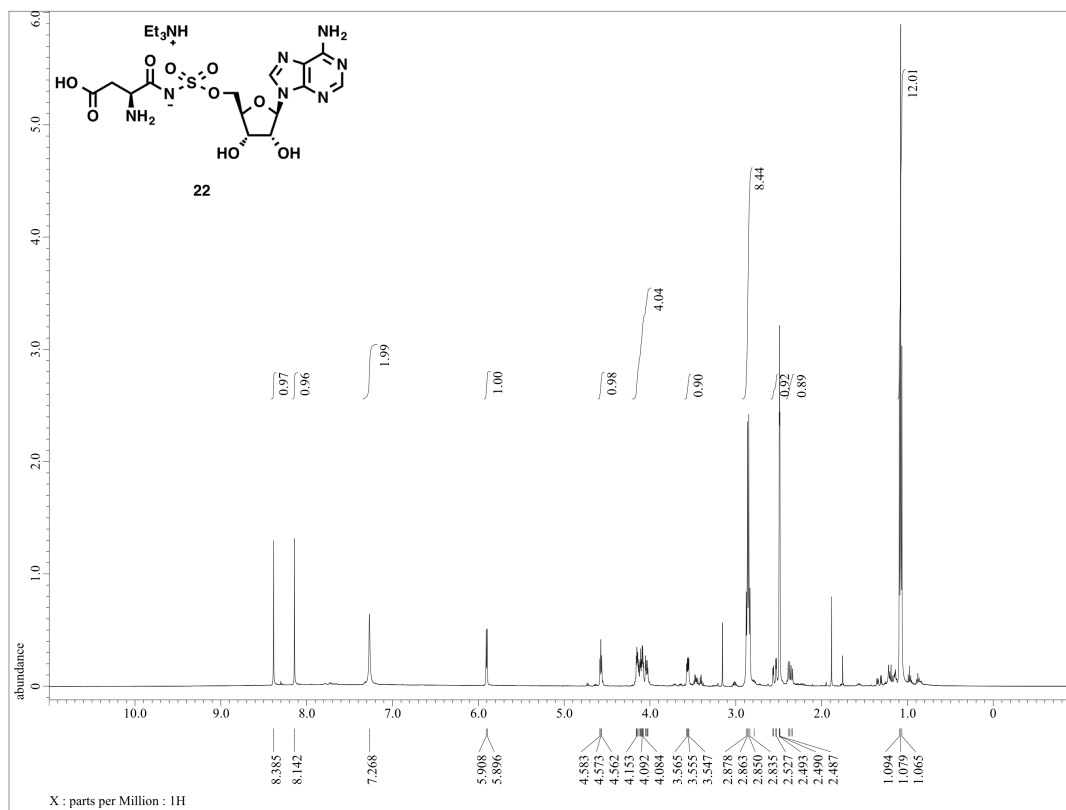
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **21**



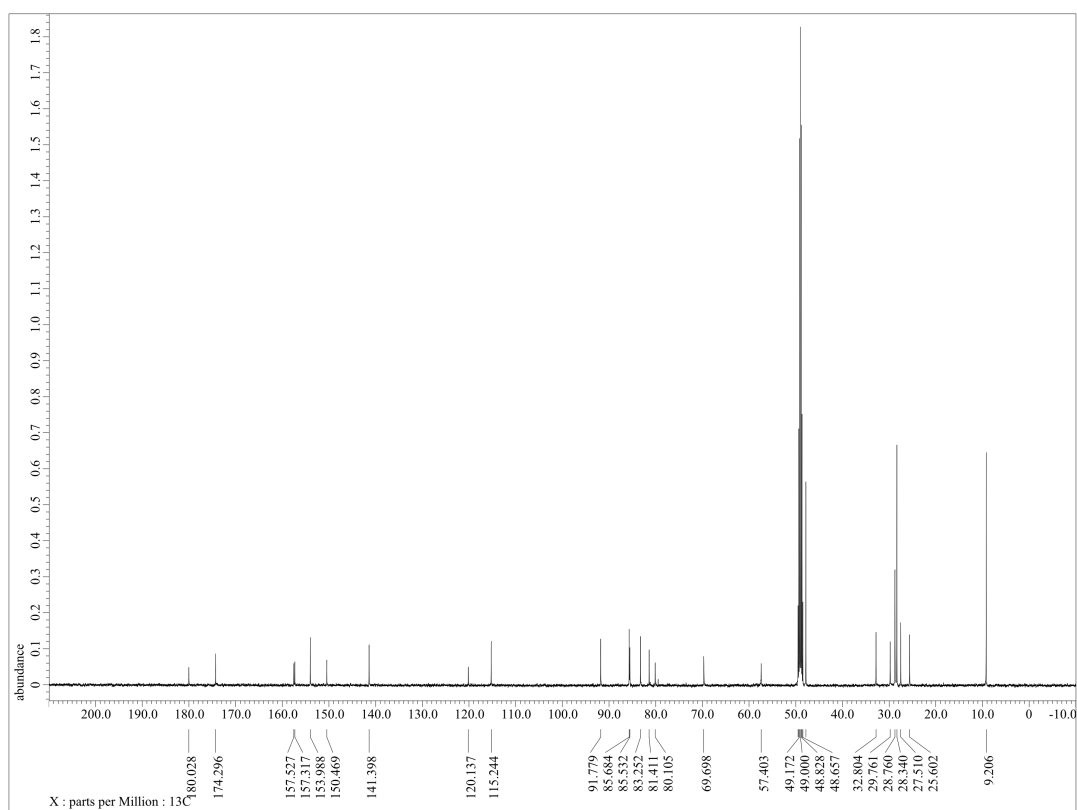
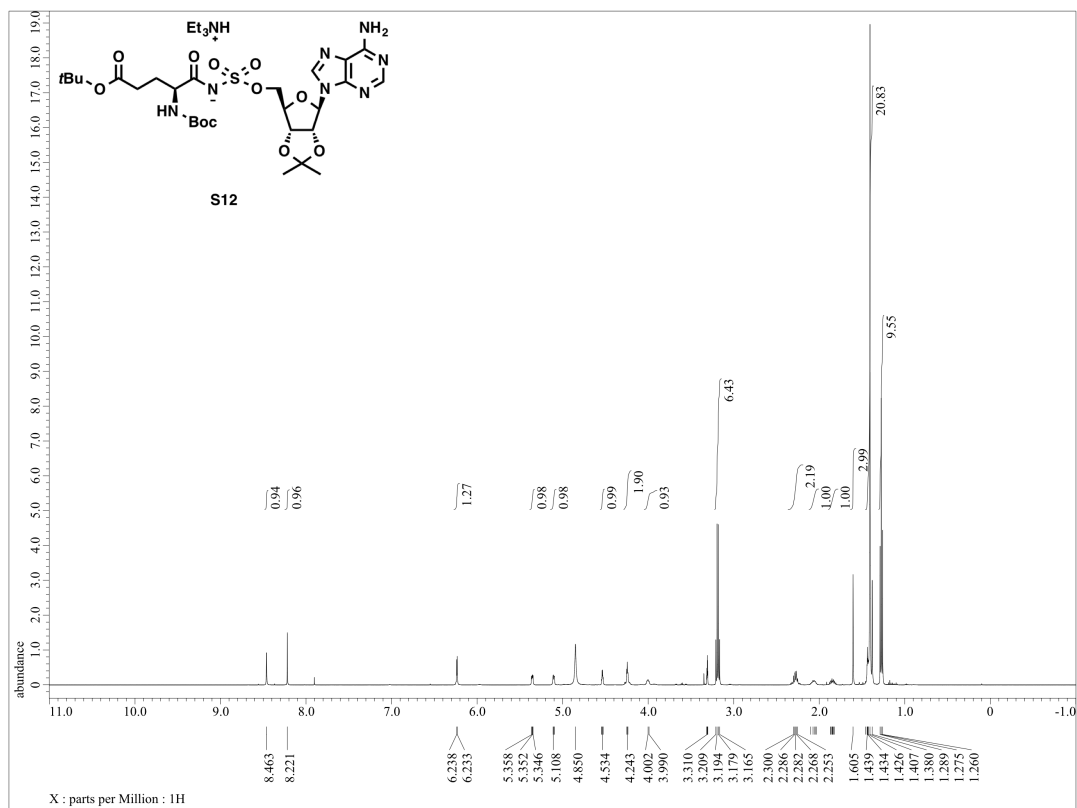
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S11**



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **22**

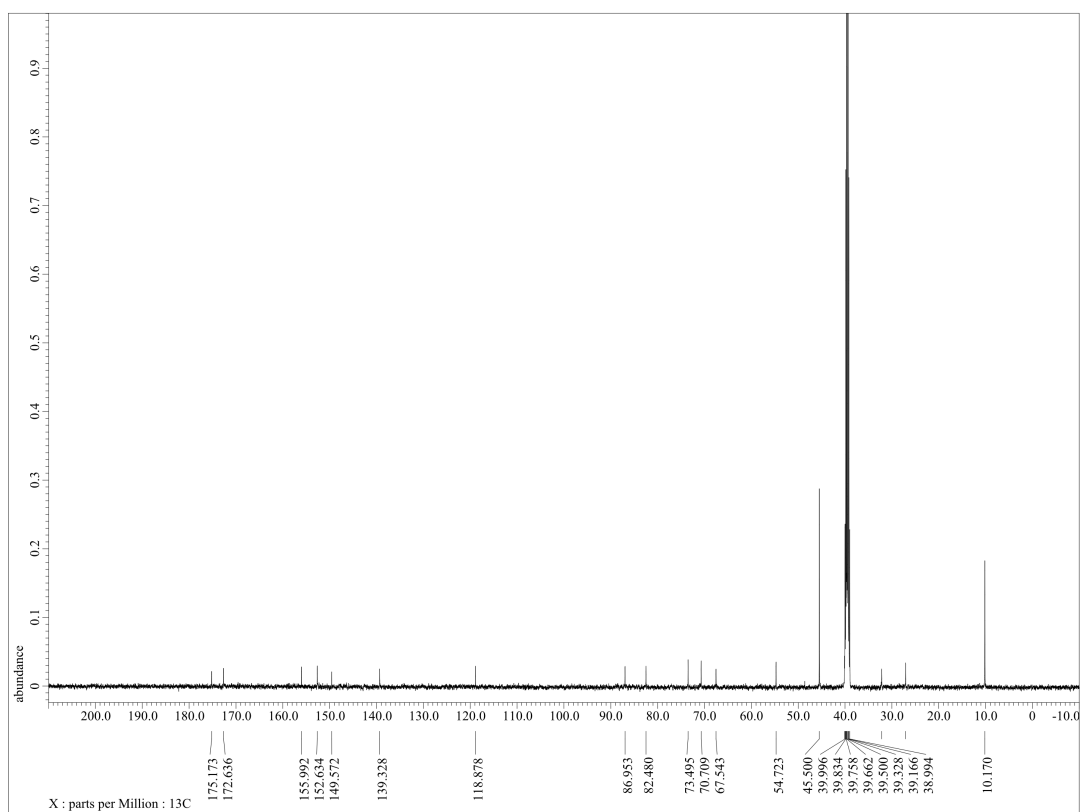
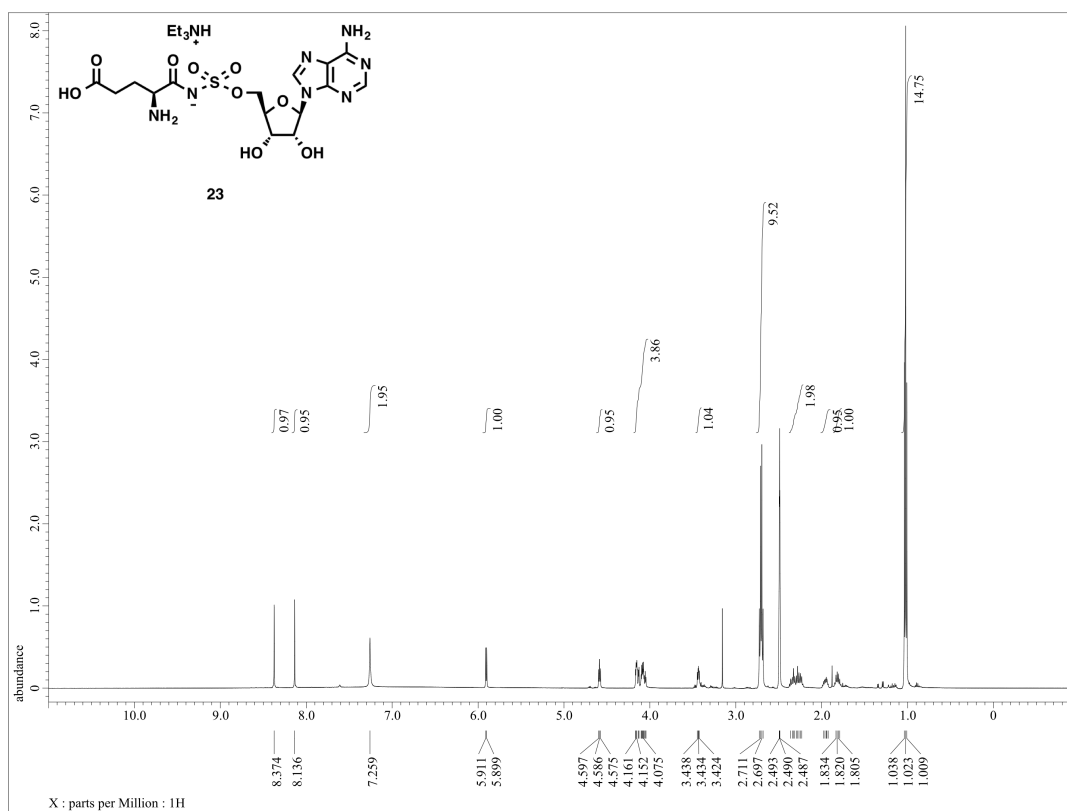


<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) spectra of **S12**

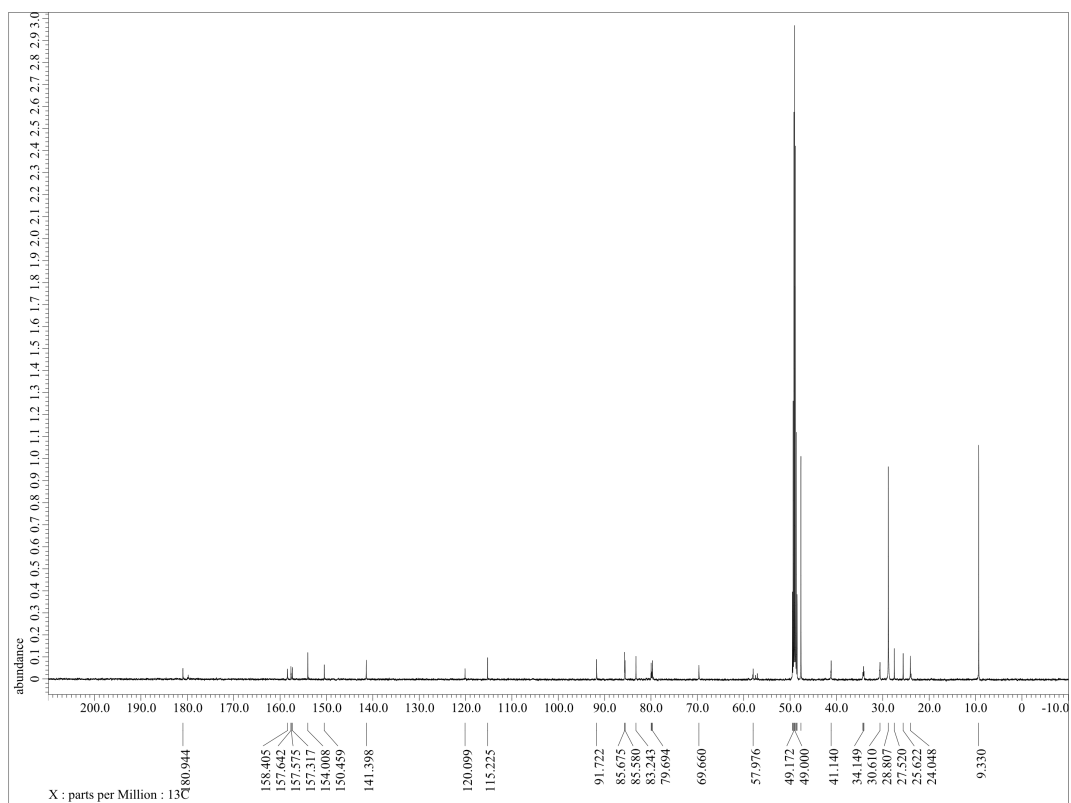
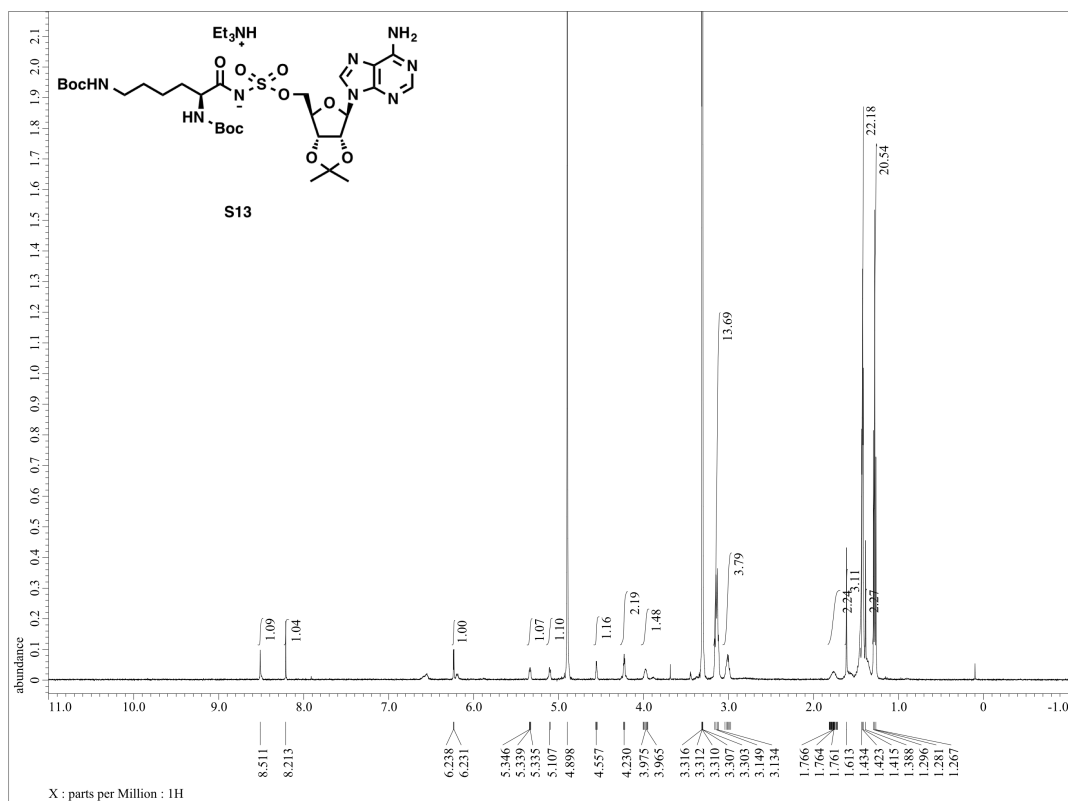




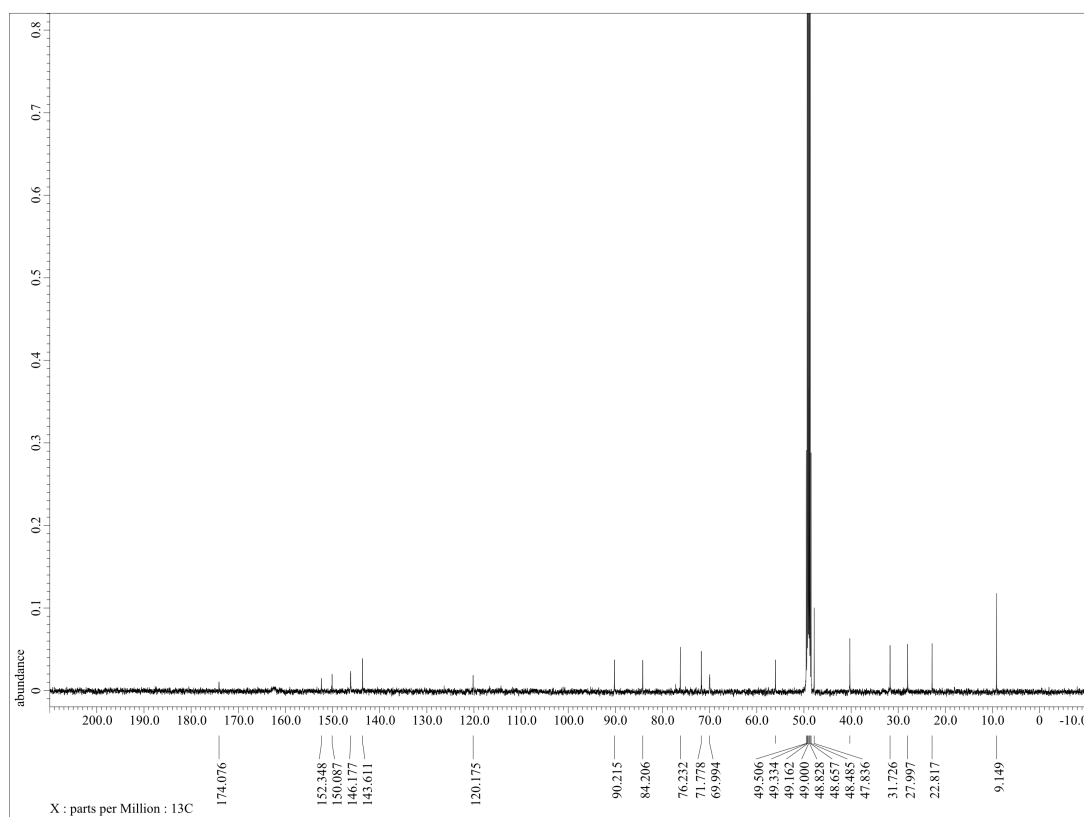
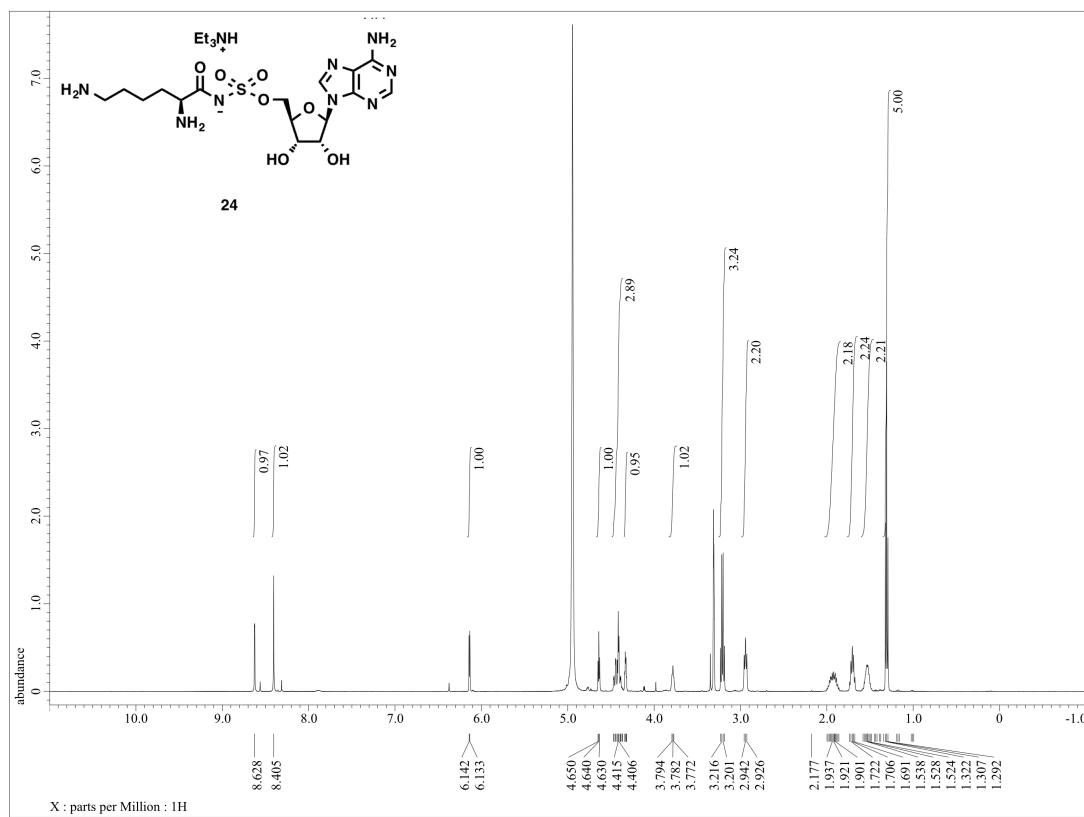
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **23**



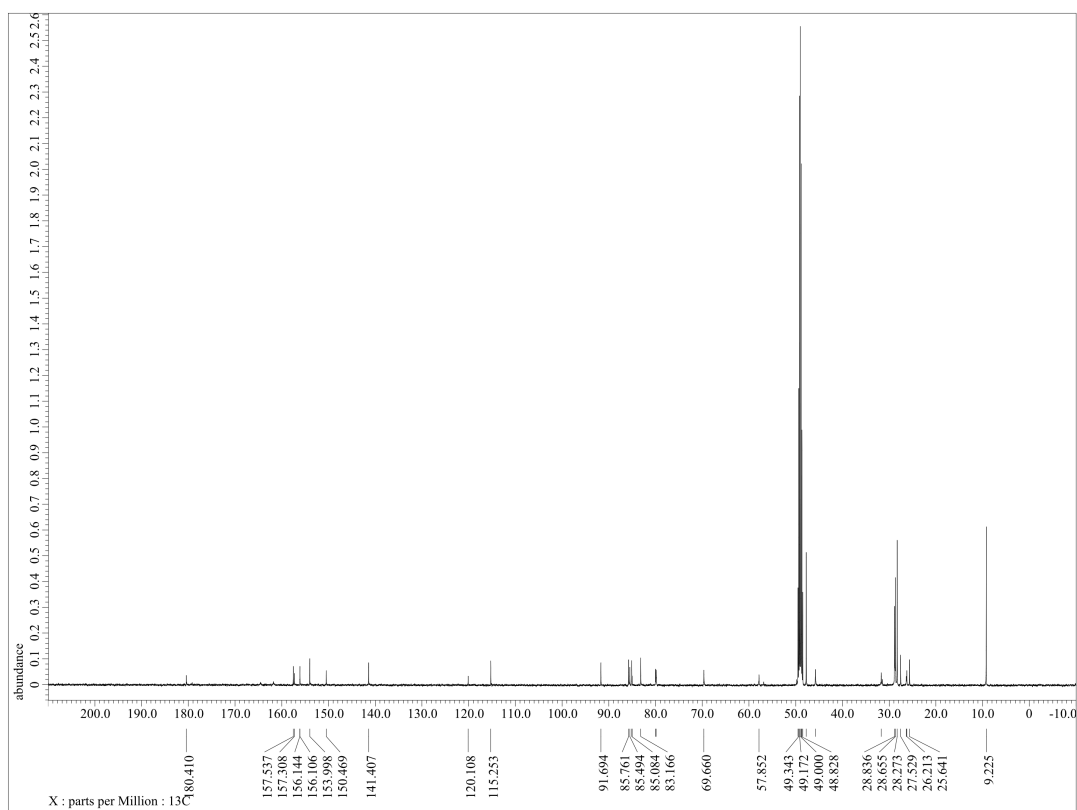
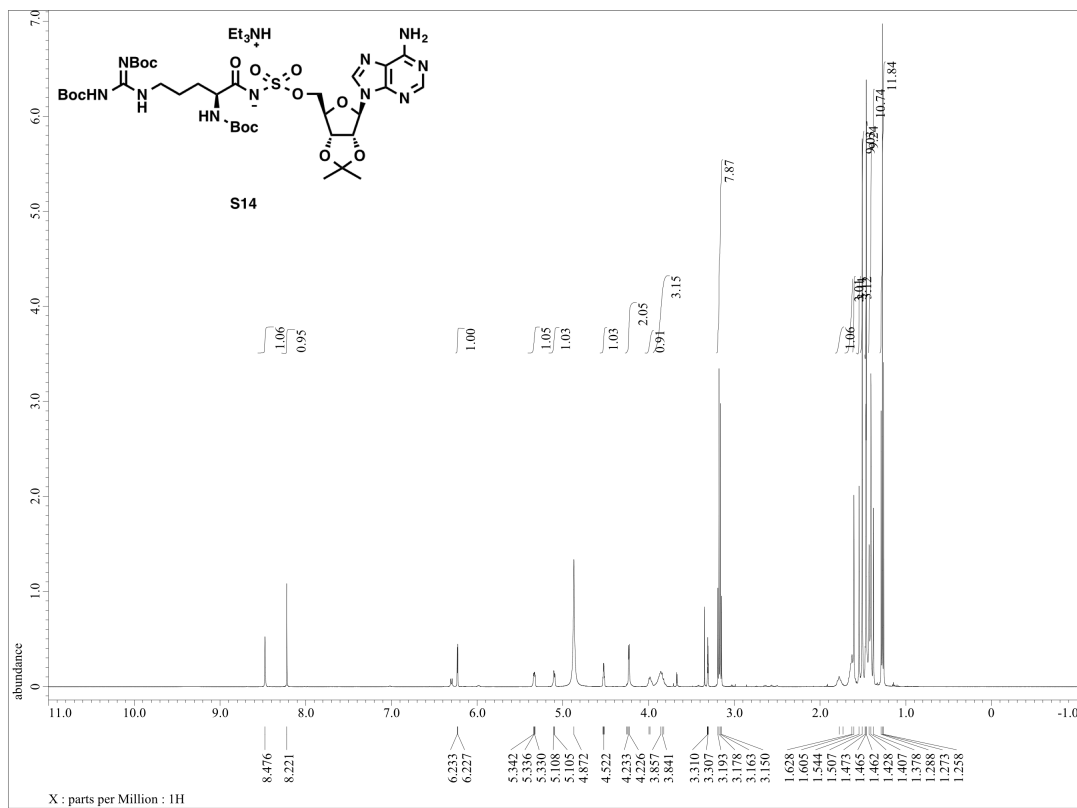
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S13**



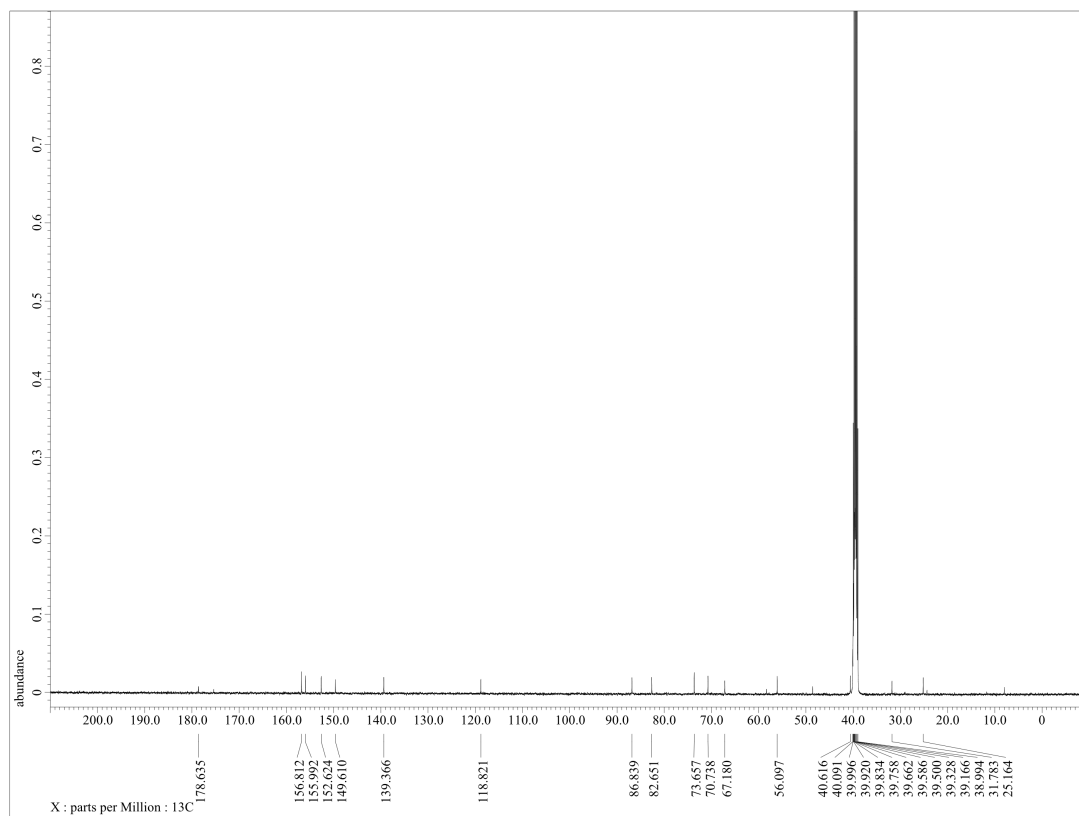
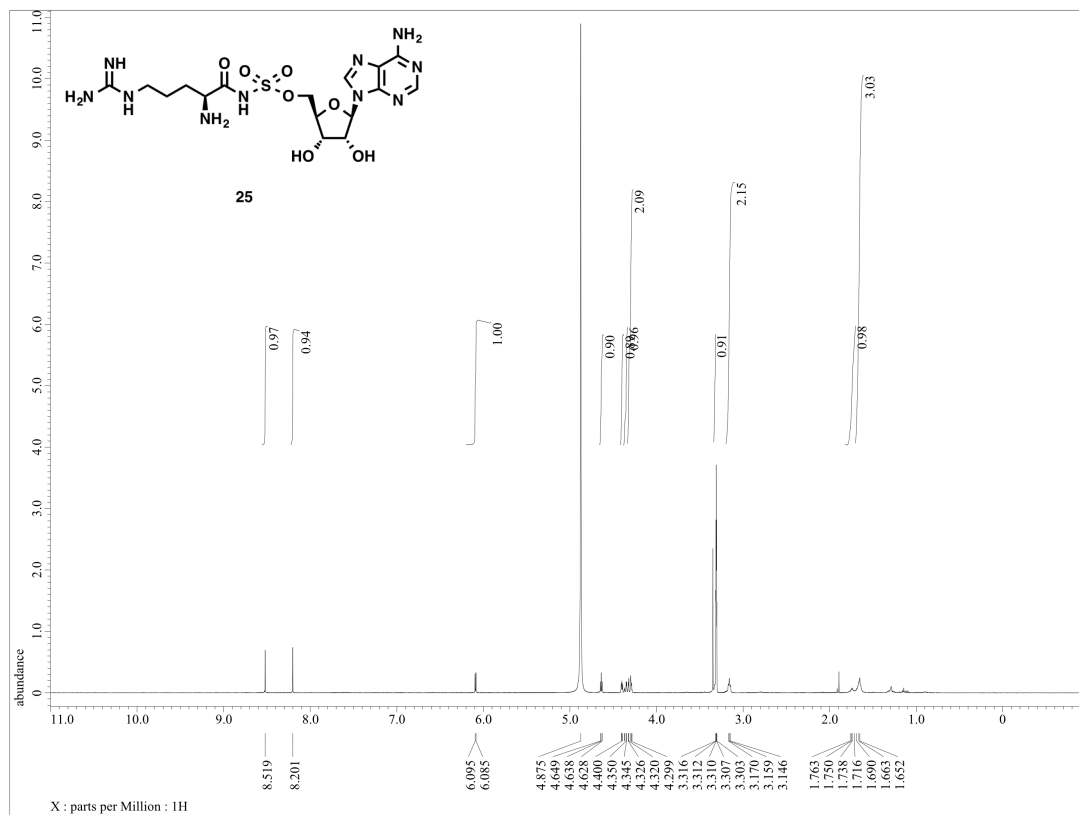
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **24**



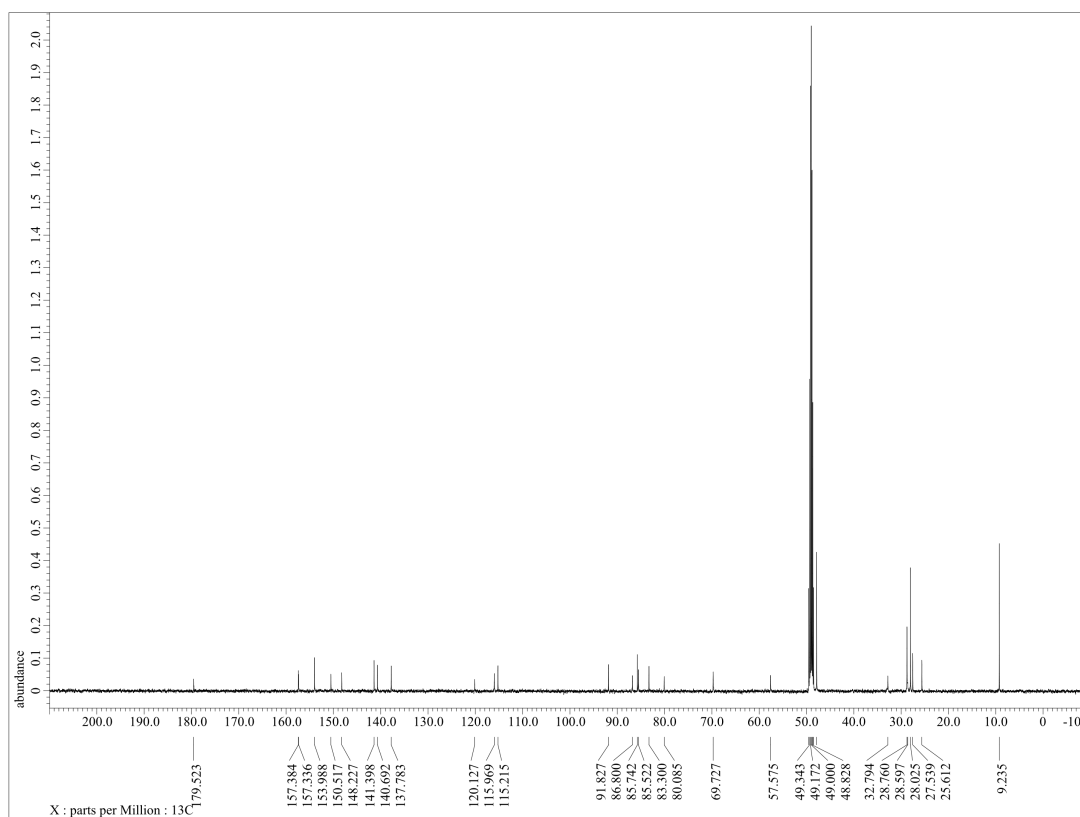
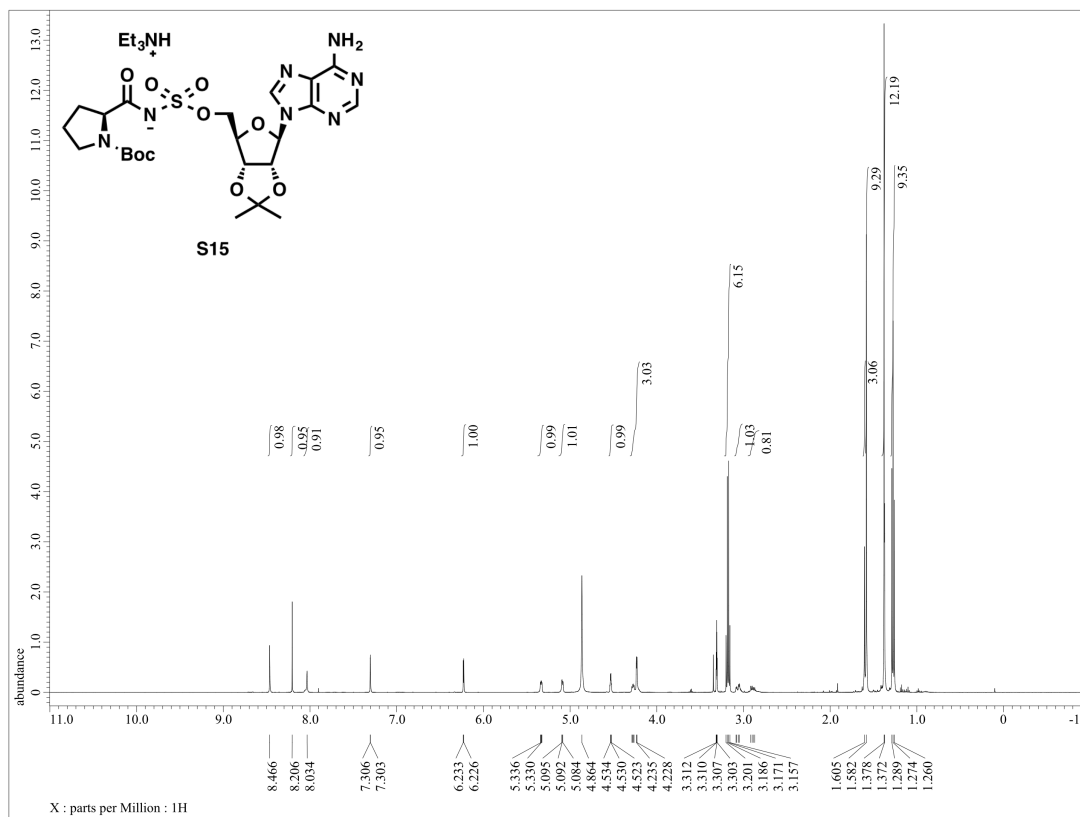
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S14**



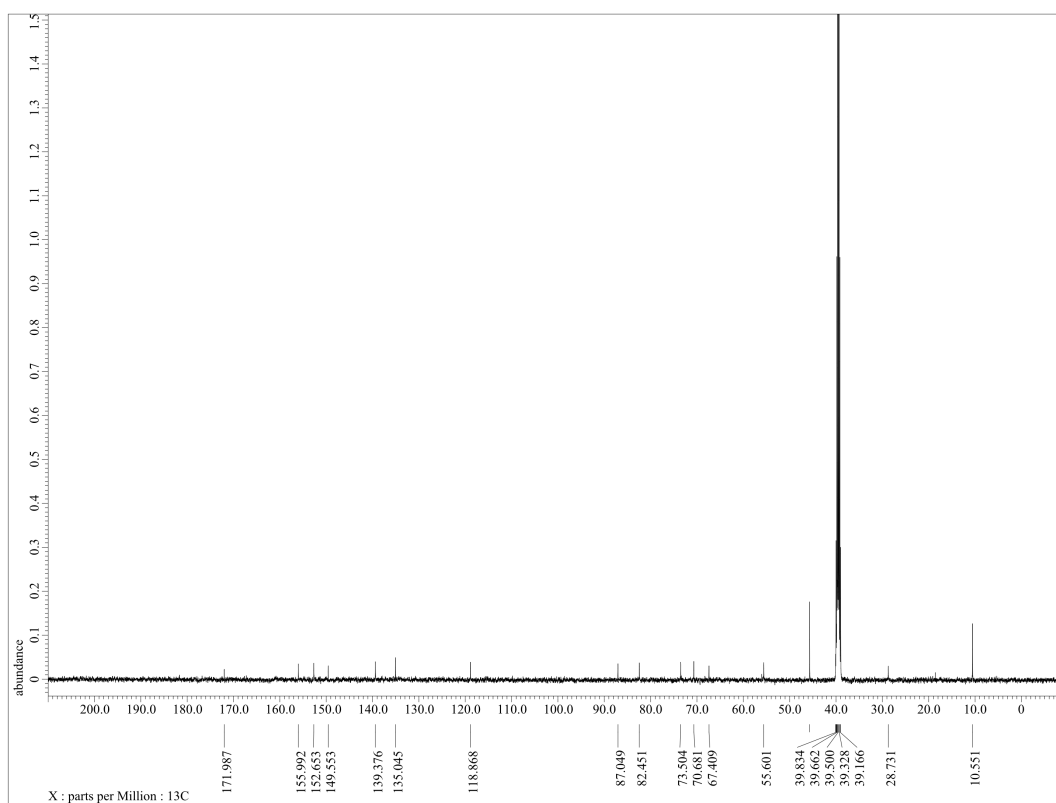
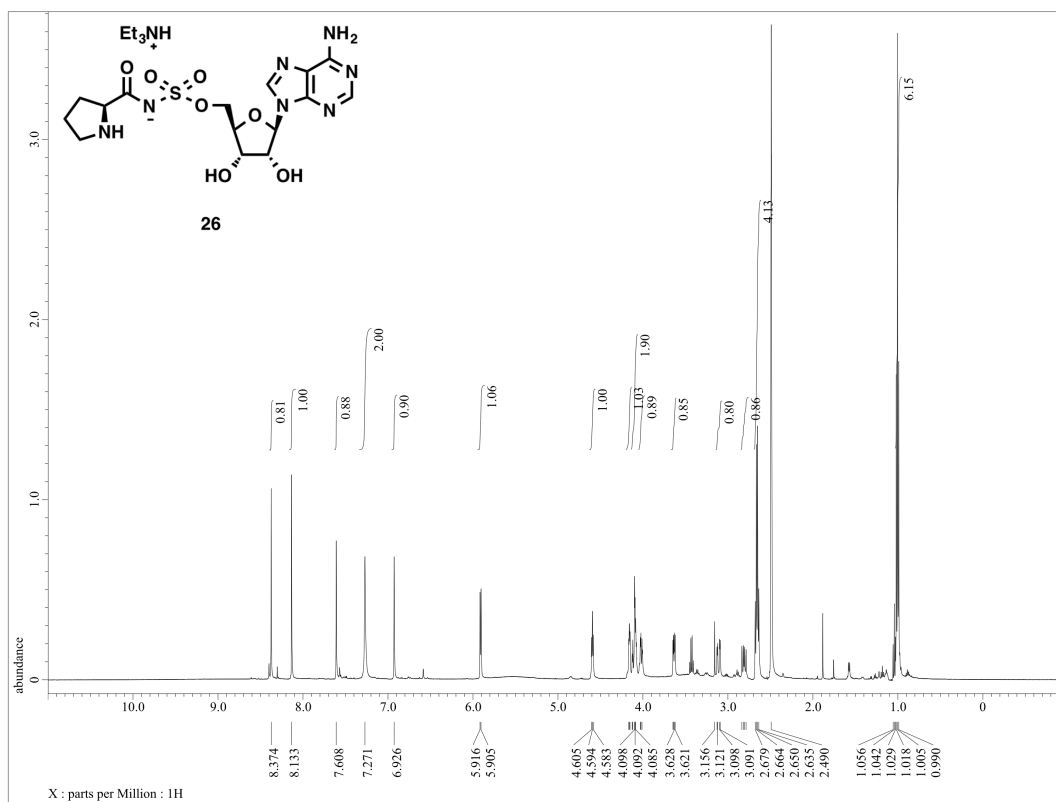
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) spectra of **25**



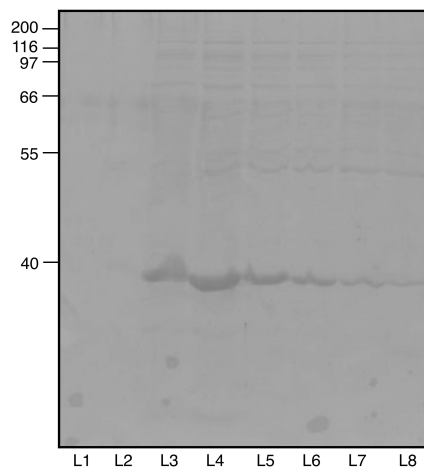
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **S15**



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **26**

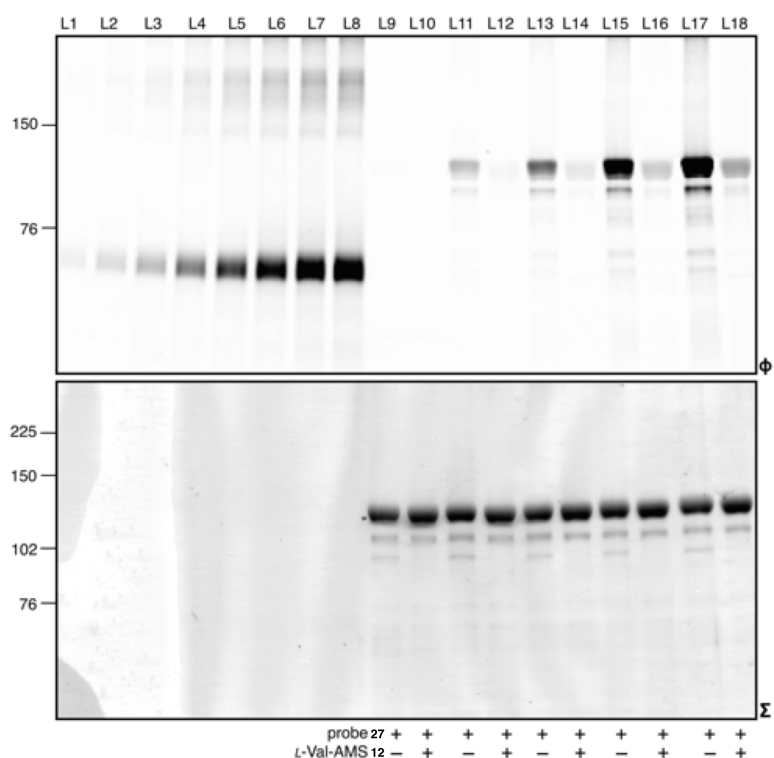


## 第二章

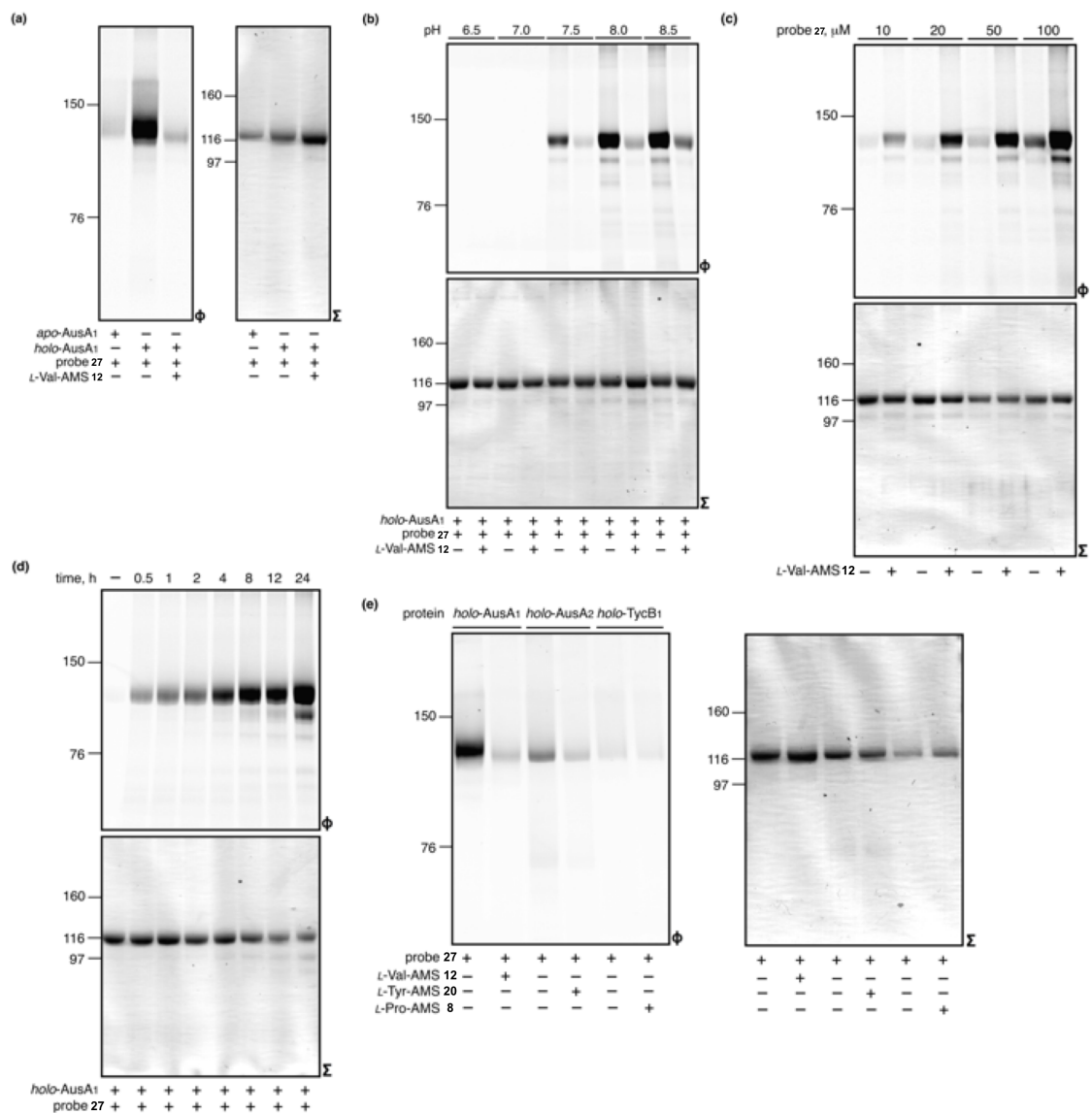


**Figure S2-1. Full gel displaying the purification of native Sfp.** Gel lanes depict fractions taken during anion exchange chromatography and as follows: L1 = 10 mM NaCl wash, L2 = 50 mM NaCl wash, L3–L8 = 100 mM NaCl wash. The target protein was collected and used from L3–L6. The gel was stained with Coomassie (Colloidal Coomassie Blue Stain).

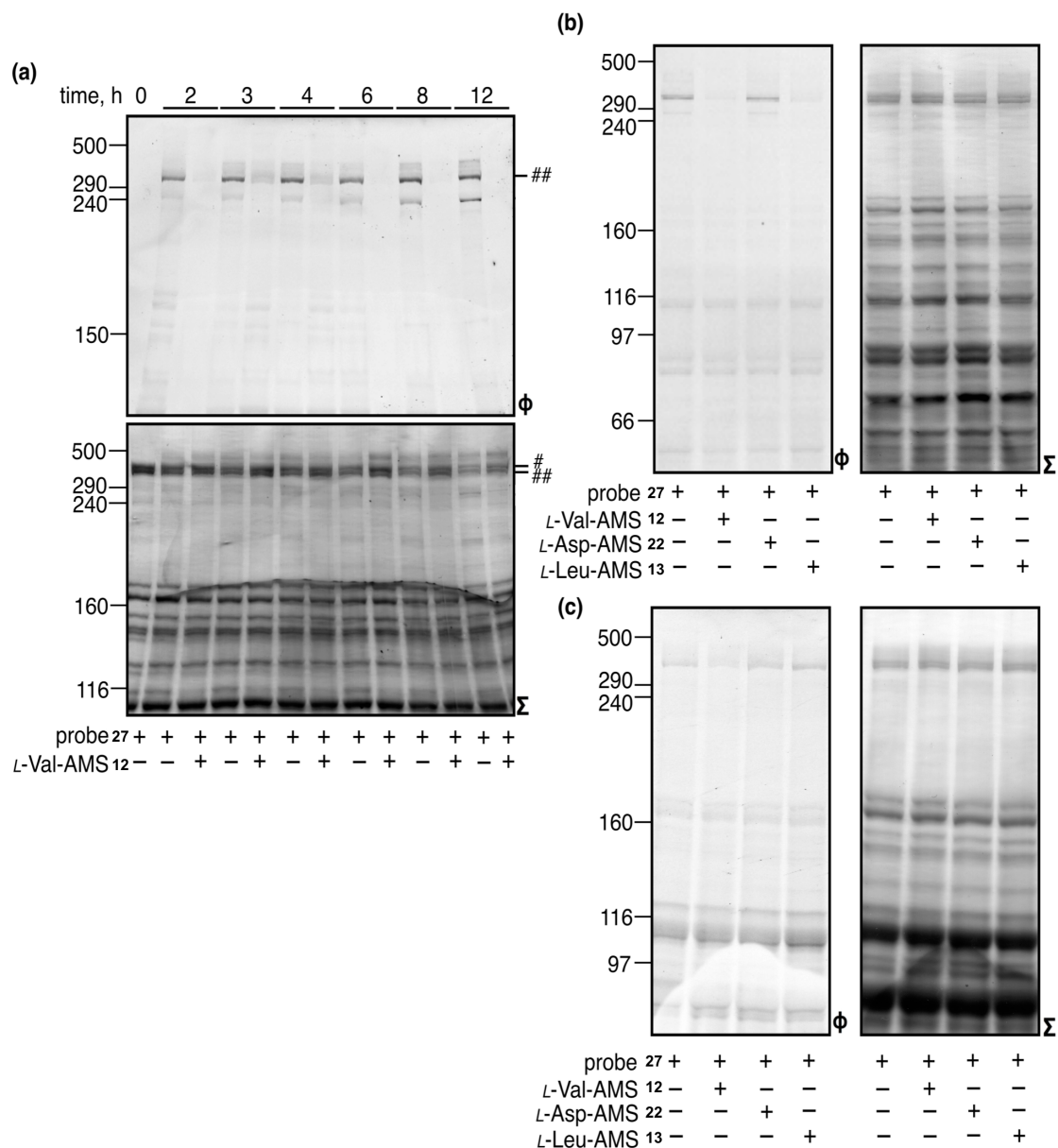




**Figure S2-2. Measurements of labeled recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub>.** (a) Fluorescent and Coomassie stained SDS-PAGE gel of Rh-BSA, a standard for fluorescent intensity and recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> with probe **27**. Recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> (1 μM) was reacted with probe **27** (1–100 μM) in either the absence or presence of 1 mM L-Val-AMS **12** for 12 h at 25 °C. Gel lanes are as follows: L1 = 50 nM Rh-BSA, L2 = 100 nM Rh-BSA, L3 = 200 nM Rh-BSA, L4 = 400 nM Rh-BSA, L5 = 600 nM Rh-BSA, L6 = 800 nM Rh-BSA, L7 = 1000 nM Rh-BSA, L8 = 1200 nM Rh-BSA, L9 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub> and 1 μM probe **27**, L10 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub>, 1 μM probe **27**, and 1 mM L-Val-AMS **12**, L11 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub> and 10 μM probe **27**, L12 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub>, 10 μM probe **27**, and 1 mM L-Val-AMS **12**, L13 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub> and 20 μM probe **27**, L14 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub>, 20 μM probe **27**, and 1 mM L-Val-AMS **12**, L15 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub> and 50 μM probe **27**, L16 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub>, 50 μM probe **27**, and 1 mM L-Val-AMS **12**, L17 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub> and 100 μM probe **27**, L18 = 1 μM *holo*-AusA<sub>1</sub>, 100 μM probe **27**, and 1 mM L-Val-AMS **12**. (b) A structure of Rh labeled AusA<sub>1</sub> (Rh-AusA<sub>1</sub>). For each panel, the image (Φ) denotes the fluorescence observed with  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm and  $\lambda_{\text{ex}} = 580$  nm and the image (Σ) depicts total protein content by staining with Coomassie (Colloidal Coomassie Blue Stain). Full image for gel in Fig. 2-7c.

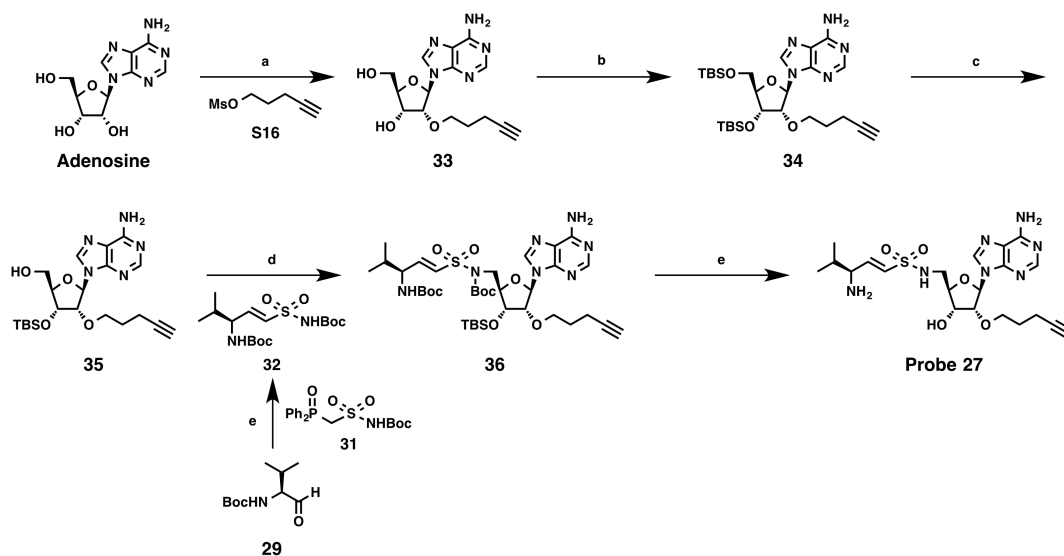


**Figure S2-3. Full images of SDS-PAGE gels from Figure 2-6, 2-7 and 2-8.** For each panel, the image ( $\Phi$ ) denotes the fluorescence observed with  $\lambda_{ex} = 532$  nm and  $\lambda_{em} = 580$  nm and the image ( $\Sigma$ ) depicts total protein content by staining with Coomassie (Colloidal Coomassie Blue Stain). (a) Full image for gel in Fig. 2-6. (b) Full image for gel in Fig. 2-7a. (d) Full image for gel in Fig. 2-7b. (e) Full image for gel in Fig. 2-8.



**Figure S2-4. Full images of SDS-PAGE gels from Figure 2-13, 2-14 and 2-15.** For each panel, the image ( $\Phi$ ) denotes the fluorescence observed with  $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$  and the image ( $\Sigma$ ) depicts total protein content by staining with Coomassie (Colloidal Coomassie Blue Stain). (a) Full image for gel in Fig. 2-13. (b) Full image for gel in Fig. 2-14. (c) Full image for gel in Fig. 2-15.

## Chemical Synthetic Procedures



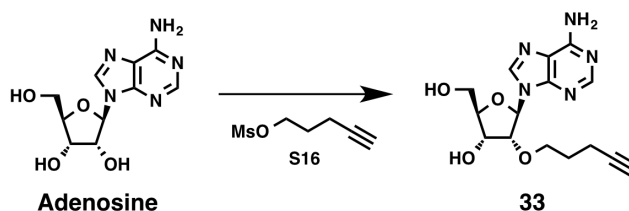
**Scheme S2-1. Synthetic route to probe 27.** Reagents and conditions: [a] NaH, **S16**, DMF, rt, 7.1%; [b] TBSCl, imidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 81%; [c] TCA, THF, H<sub>2</sub>O, rt, 75%; [d] **32**, DEAD, Ph<sub>3</sub>P, THF, rt, 78%; [e] LiHMDS, **31**, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 47%; [f] 1) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 2) TBAF, THF, rt, quant., over two steps.

**General Synthetic Methods:** All commercial reagents were used as provided unless otherwise indicated. **S16**<sup>61</sup>, **29**<sup>62</sup> and **31**<sup>48</sup> are known compounds. These compounds were prepared according to published literature procedures. All reactions were carried out under an atmosphere of nitrogen in dry solvents with oven-dried glassware and constant magnetic stirring unless otherwise noted. High performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a Prominence CBM-20A (Shimadzu) system equipped with a Prominence SPD-20A UV/VIS detector (Shimadzu). <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded at 500 MHz. <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded at 125 MHz on JEOL NMR spectrometers and standardized to the NMR solvent signal as reported by Gottlieb.<sup>53</sup> Multiplicities are given as s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, ddd = doublet of triplets, br = broad signal, m = multiplet using integration and coupling constant in Hertz. TLC analysis was performed using Silica Gel 60 F254 plates (Merck) and visualization was accomplished with ultraviolet light ( $\lambda = 254$  nm) and/or the appropriate stain [phosphomolybdic acid, iodine, ninhydrin, and potassium permanganate]. Silica gel chromatography was carried out with SiliaFlash F60 230-400 mesh (Silicycle), according to the method of Still.<sup>54</sup> Mass spectral data

were obtained using a LCMS-IT-TOF mass spectrometer (Shimadzu).

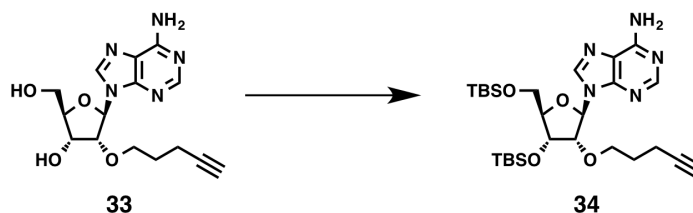
**Chemical Synthesis of 27** Compound number in bold refers to the structures shown in Scheme S2-1.

**(2R,3R,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)-4-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-3-ol (33)**



NaH (2.2 g of a 60% suspension in mineral oil, 56.1 mmol) was added to a solution of adenosine (10.0 g, 37.4 mmol) in DMF (150 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h and compound **S16** (7.4 g, 45.6 mmol) was added. After 3 days, the reaction was quenched by the addition of H<sub>2</sub>O and the DMF and H<sub>2</sub>O were removed at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (CHCl<sub>3</sub> to 19:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH), and HPLC [COSMISIL C<sub>18</sub>-AR-II: C-18 reverse-phase column,  $\phi$  10 mm  $\times$  250 mm, methanol/water (30:70), 8.0 mL/min, 200 nm,  $t_R$ : 34.0 min] to afford compound **33** as a white solid (900 mg, 7.1%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.35 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.06 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 4.54 (dd,  $J$  = 6.5, 5.0 Hz, 1H), 4.45 (dd,  $J$  = 5.0, 2.5 Hz, 1H), 4.17 (dd,  $J$  = 5.5, 2.5 Hz, 1H), 3.89 (dd,  $J$  = 13.0, 3.0 Hz, 1H), 3.76 (dd,  $J$  = 13.0, 3.0 Hz, 1H), 3.73-3.68 (m, 1H), 3.57-3.49 (m, 1H), 2.21-2.09 (m, 2H), 2.07 (t,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 1.77-1.58 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  157.6, 153.6, 150.0, 141.9, 121.0, 89.4, 88.6, 84.1, 83.3, 71.2, 70.3, 69.7, 63.3, 29.6, 15.5. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, 334.1510; found 334.1508.

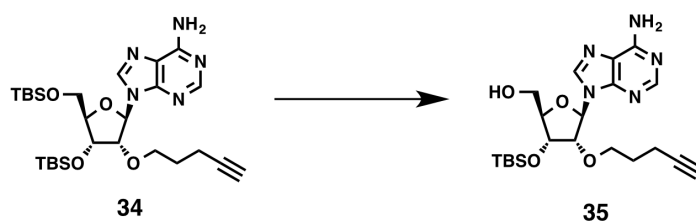
**9-((2R,3R,4R,5R)-4-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)-3-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amine (34)**



TBSCl (2.4 g, 15.9 mmol) and imidazole (2.2 g, 32.3 mmol) were added to a solution of

compound **33** (870 mg, 2.61 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL). The solution was stirred at room temperature. After 19 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with a 0.1 M aqueous HCl solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (2:3 EtOAc/hexane) to afford compound **34** as a white solid (1.2 g, 81%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.35 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.14 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 4.50 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.12 (dt, *J* = 5.3, 2.9 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz), 3.78 (dd, *J* = 11.5, 2.3 Hz, 1H), 3.67 (m, 2H), 2.25 (dt, *J* = 7.0, 2.5 Hz, 2H), 1.87 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.77 (m, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.11 (s, 6H), 0.11 (s, 3H), 0.10 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 156.1, 152.8, 149.4, 138.9, 119.9, 86.8, 84.7, 83.3, 82.1, 69.9, 68.8, 68.7, 61.73, 28.5, 25.9, 25.6, 25.5, 18.3, 18.0, 14.9, -4.7, -5.0, -5.5, -5.6. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>, 562.3239; found, 562.3298.

**((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)methanol (**35**)**

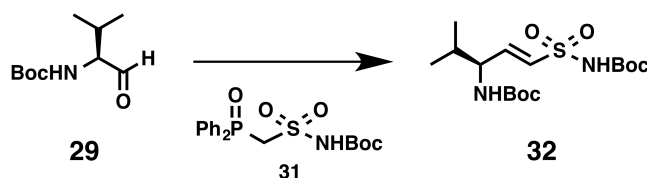


Compound **34** (1.0 g, 1.78 mmol) was dissolved in a 4:1 (v/v) mixture of THF and H<sub>2</sub>O at room temperature. Trichloroacetic acid (4.2 g, 25.7 mmol) was added. Stirring was continued at room temperature for 2 h. The reaction was quenched by the addition of a 1 M aqueous NaOH solution. The resulting mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (5:1 EtOAc/hexane) to afford compound **35** as a white solid (600 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.33 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 6.03 (s, 2H), 5.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.69 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.95 (dd, *J* = 13.1, 1.7 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.56 (dt, *J* = 8.5, 4.6 Hz, 1H), 3.28 (m, 1H), 2.10 (m, 2H), 1.80 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 1.61 (m, 2H), 0.95 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.13 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.4, 152.3, 148.5, 140.8, 121.2, 89.6, 89.5, 83.1, 81.0, 72.0, 69.1, 68.9, 62.9, 28.3, 25.7, 18.2, 14.8, -4.7, -4.7. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd

for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si, 448.2375; found, 448.2388.

*tert*-Butyl

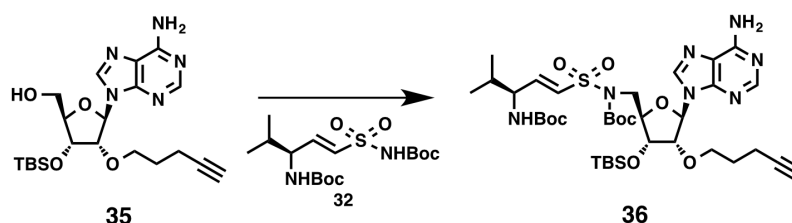
**(*S,E*)-1-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)sulfonyl)-4-methylpent-1-en-3-yl)carbamate (32)**



LiHMDS (7.6 mL, 1.3 M in THF, 9.88 mmol) was added to a solution of compound **31** (1.5 g, 3.96 mmol) in DMF (5 mL). The solution was stirred at rt for 1 h and **29** (500 mg, 2.48 mmol) was added. Stirring was continued at room temperature for 3 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc. The mixture was washed with a 0.1 M aqueous HCl solution and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (1:4 EtOAc/hexane) to afford compound **32** as a white solid (440 mg, 47%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (br, 1H), 6.91 (dd, *J* = 14.9, 5.2 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.28 (br, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 0.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.3, 149.8, 147.4, 127.9, 83.7, 80.0, 56.2, 41.1, 32.1, 28.3, 27.9, 18.8, 17.9, 14.2. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaS, 401.1717; found, 401.1798.

*tert*-Butyl

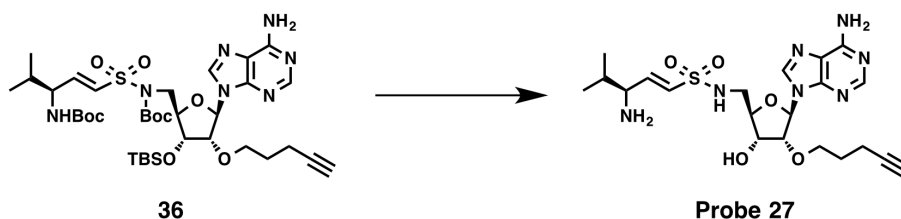
**(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl) (((*S,E*)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpent-1-en-1-yl)sulfonyl)carbamate (36)**



**32** (49.2 mg, 0.13 mmol), PPh<sub>3</sub> (35.2 mg, 0.13 mmol), and DEAD (60.9 μL, 2.2 M in toluene, 0.13 mmol) were added to a solution of compound **35** (50.0 mg, 0.11 mmol) in THF (6 mL). The solution was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by

flash chromatography (1:1 to 1:2, EtOAc/hexane and 1:99 to 3:97 MeOH/CHCl<sub>3</sub>) to afford compound **36** as a colorless amorphous solid (70.7 mg, 78%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 6.79 (dd, *J* = 15.0, 5.0 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.72 (br, 2H), 4.75 (dd, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.56 (br, 1H), 4.43 (br, 1H), 4.36-4.27 (m, 1H), 4.16 (dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz, 1H), 3.68-3.59 (m, 1H), 3.59-3.48 (m, 1H), 2.21-2.12 (m, 1H), 1.97-1.79 (m, 1H), 1.85 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.79-1.62 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.92 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.13 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.7, 155.2, 153.0, 151.1, 149.8, 147.1, 140.3, 128.4, 120.6, 87.5, 85.0, 83.5, 83.2, 80.2, 72.0, 69.1, 68.8, 56.2, 48.1, 32.3, 28.5, 28.4, 28.0, 25.8, 18.9, 18.2, 18.0, 15.0, -4.6, -4.7. HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>SSi, 808.4094; found 808.4034.

**(*S,E*)-3-Amino-*N*-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3-hydroxy-4-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-4-methylpent-1-ene-1-sulfonamide (**27**)**



Compound **36** (58.6 mg, 0.73 mmol) was dissolved in a 1:1 (v/v) mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and TFA at 0 °C. Stirring was continued at 0 °C for 12 h. The flask was placed on the rotary evaporator, and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and TFA were removed at reduced pressure. The residue was dissolved in THF (2 mL). The solution was stirred at room temperature and TBAF (380 μL of a 1 M TBAF solution in THF) was added. After 10 h, the reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC [Senshu pak: PEGASIL ODS SP 100 reverse-phase column, φ 20 mm × 250 mm, acetonitrile/aqueous TFA (0.1%, 20:80), 8.0 mL/min, 210 nm, *t*<sub>R</sub>: 14.5 min] to afford compound **27** as a colorless oil (37.4 mg, quant.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.44 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.67 (dt, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 4.21 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.39 (dd, *J* = 6.0, 3.8 Hz, 1H), 3.37 (t, *J* = 3.4 Hz, 1H), 2.18 (m, 2H), 2.12 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.05 (dd, *J* = 6.9, 2.9 Hz, 3H), 1.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 153.2,



149.7, 147.0, 143.8, 173.1, 135.34, 121.0, 89.4, 85.6, 84.1, 82.9, 71.3, 70.5, 69.8, 57.9, 45.3, 32.2, 29.6, 18.8, 17.9, 15.5. HRMS (ESI+):  $[M+H]^+$  calcd for  $C_{21}H_{32}N_7O_5S$ , 494.2180; found, 494.2242.

## Chemical Biology Procedures

**Protein expression and materials:** Recombinant proteins *apo-AusA<sub>1</sub>*, *apo-AusA<sub>2</sub>*, and *holo-TycB<sub>1</sub>* were expressed and purified as previously described.<sup>31, 57</sup> The *holo-TycB<sub>1</sub>* expression construct was kindly provided by Prof. Mohamed A. Marahiel at Philipps-Universität Marburg, Germany. Recombinantly expressed Sfp (PPTase; *Bacillus subtilis*) was overexpressed in *E. coli* as the native protein (untagged) and purified previously.<sup>63</sup> The Sfp expression construct was kindly provided by Prof. Michael D. Burkart at University of California, San Diego, USA.

**Preparation of lysates for proteomic labeling experiments:** *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ATCC 21332) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The seed culture from frozen stock was revived for 24 h and grown in a minimal salt (MS) medium with 4 mM of  $Fe^{2+}$  at 30 °C at 200 rpm. The medium contained 4% glucose, 30 mM  $KH_2PO_4$ , 30 mM  $Na_2HPO_4$ , 50 mM  $NH_4NO_3$ , 800  $\mu M$   $MgSO_4$ , 4 mM  $FeSO_4$ , 7  $\mu M$   $CaCl_2$ , and 4  $\mu M$  sodium EDTA. The seed cultures (2.5 mL) was transferred to 250 mL of medium which contained 4% glucose, 30 mM  $KH_2PO_4$ , 30 mM  $Na_2HPO_4$ , 50 mM  $NH_4NO_3$ , 800  $\mu M$   $MgSO_4$ , 4 mM  $FeSO_4$ , 7  $\mu M$   $CaCl_2$  and 4  $\mu M$  sodium EDTA, and the resulting mixture was incubated for 24 h at 30 °C at 200 rpm. The cells were harvested by centrifugation and stored in the freezer until used. The frozen cell pellet was resuspended in 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM TCEP, and protease inhibitor cocktail. Because of the lability of the synthetase during mechanical cell disruption processes, a gentle treatment of cells with lysozyme (0.2 mg/mL) was used to release intracellular protein. The cell suspension was incubated at 0 °C for 30 min. The mixture was then incubated at 30 °C for 30 min. The solution was centrifuged for 10 min at 15,000 rpm and the pellet was discarded. The total protein concentration was quantitated by the method of Bradford.<sup>60</sup>

**Phosphopantetheinylation of *apo-AusA<sub>1</sub>* and *apo-AusA<sub>2</sub>*:** The *in vitro* phosphopantetheinylation of *apo-AusA<sub>1</sub>* was conducted in a 1 mL reaction containing 0.1  $\mu g/\mu L$  *apo-AusA<sub>1</sub>*, 0.008  $\mu g/\mu L$  Sfp (native), 15 mM  $MgCl_2$ , 1 mM TCEP, 0.5 mM CoA, and 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, at 37 °C for 12 h. The *in vitro*

phosphopantetheinylation of *apo*-AusA<sub>2</sub> was carried out in a 100 µL reaction containing 0.6 µg/µL *apo*-AusA<sub>2</sub>, 0.008 µg/µL Sfp (native), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0.5 mM CoA, and 50 mM potassium phosphate (pH 7.0), at 37 °C for 12 h. The reaction mixtures were dialyzed against 20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM TCEP using Amicon Ultra Centrifugal Filter Units, MWCO 50 kDa (Millipore). The *holo*-AusA<sub>1</sub> and *holo*-AusA<sub>2</sub> proteins were quantified by the method of Bradford.<sup>56</sup> After the addition of 10% glycerol (v/v) the proteins were stored at -80 °C.

**Labeling of recombinant *apo*-AusA<sub>1</sub> and *holo*-AusA<sub>1</sub> by probe 27:** Standard conditions for probe 27-recombinant protein reactions were as follows: recombinant *apo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) and *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) were treated with probe 27 (100 µM from a 10 mM stock in DMSO) in assay buffer [20 mM Tris (pH 8.0), 1 mM TCEP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>], respectively. Inhibition study was carried out by pre-incubation of *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) with L-Val-AMS 12 (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature. In all experiments total DMSO concentration was kept at 2.0%. After 12 h at room temperature, these samples were treated with the click reaction. Rh-azide, TCEP, TBTA ligand, and CuSO<sub>4</sub> were added to provide final concentrations of 100 µM, 1 mM, 100 µM, and 1 mM, respectively. After 1 h at room temperature, 5× SDS-loading buffer (strong reducing) was added. Samples were separated by 1D SDS-PAGE and fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

**Determination of an optimal pH for the labeling of *holo*-AusA<sub>1</sub> by probe 27:** Recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) was incubated with probe 27 (100 µM from a 10 mM stock in DMSO) in 20 mM Tris, pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, and 8.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM TCEP. For inhibition studies, *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) was pre-incubated with L-Val-AMS 12 (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature. In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.0%. After 12 h at room temperature, these samples were reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5× SDS-loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

**Time-course studies of the labeling of *holo*-AusA<sub>1</sub> with probe 27:** Recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) was treated with probe 27 (100 µM from a 10 mM stock in DMSO) in assay buffer. For inhibition studies, *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM) was pre-incubated

with L-Val-AMS **12** (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature. In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.0%. These reaction mixtures were incubated for the indicated time (0–24 h) at room temperature. These samples were reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5× SDS-loading buffer (strong reducing) and separated by gel electrophoresis. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

**Comparing the labeling property with *holo*-AusA<sub>1</sub>, *holo*-AusA<sub>2</sub>, and *holo*-TycB<sub>1</sub>:**

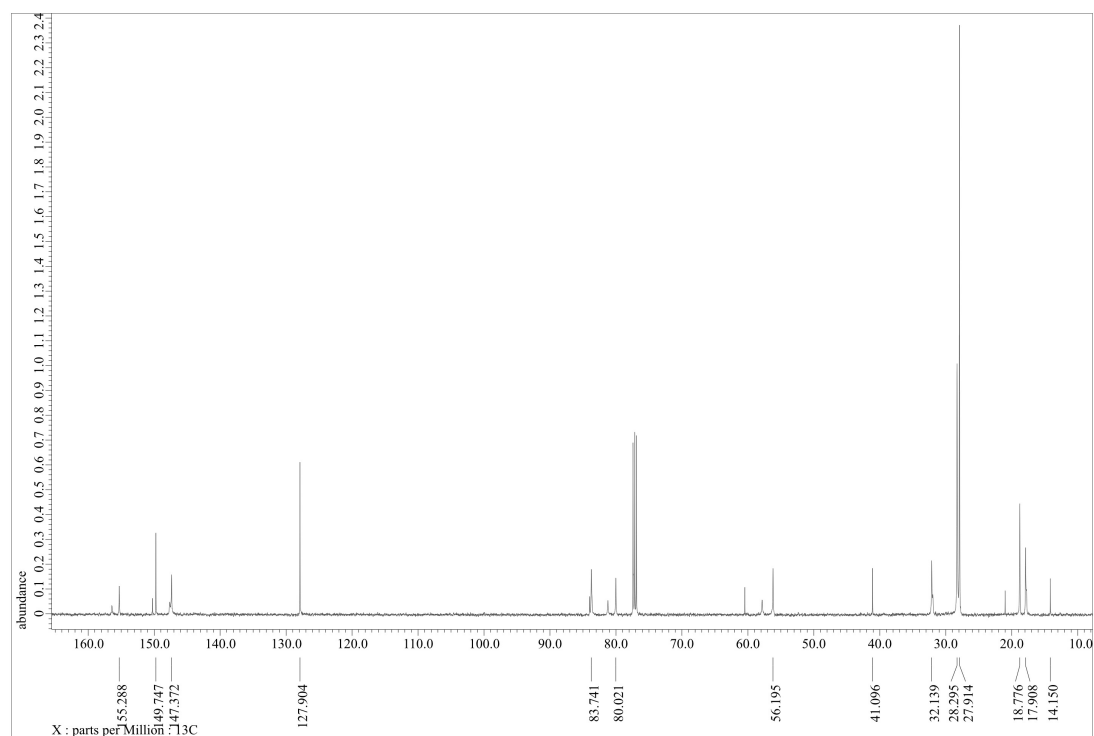
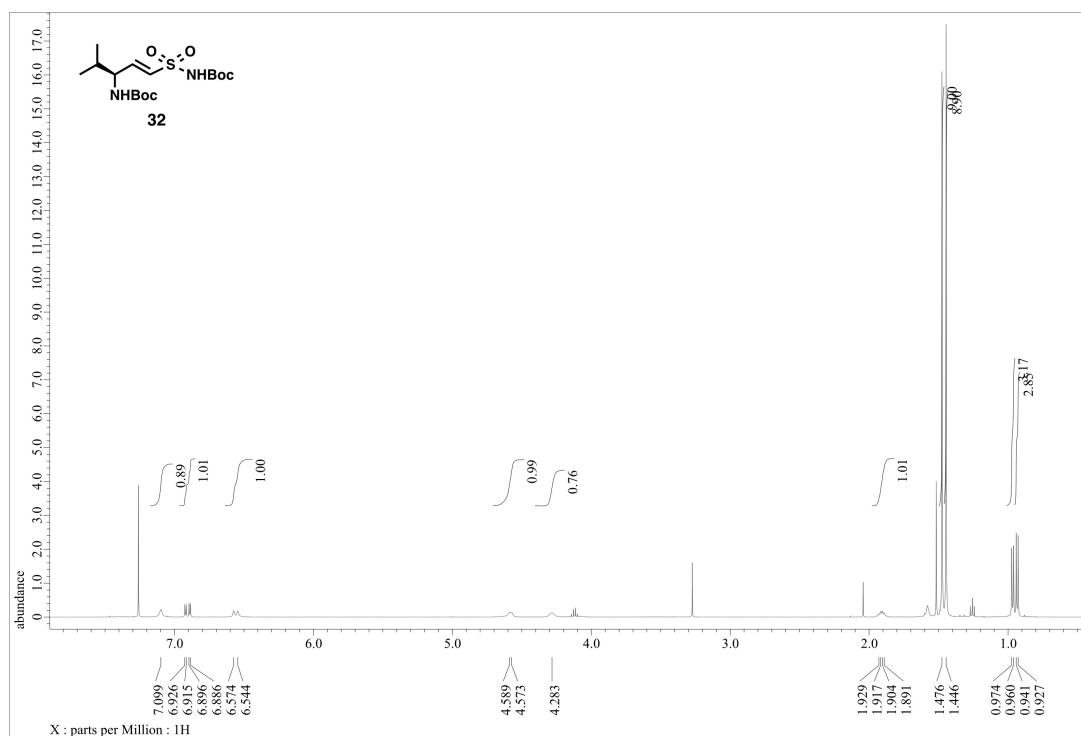
For *holo*-AusA<sub>1</sub> (A: L-Val), *holo*-AusA<sub>2</sub> (A: L-Tyr), and *holo*-TycB<sub>1</sub> (A: L-Pro) labeling experiments, probe **27** (100 μM from a 10 mM stock in DMSO) were individually added to a 50 μL reaction containing *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM), *holo*-AusA<sub>2</sub> (350 nM), *holo*-TycB<sub>1</sub> (350 nM), and assay buffer. For inhibition studies, *holo*-AusA<sub>1</sub> (350 nM), *holo*-AusA<sub>2</sub> (350 nM), and *holo*-TycB<sub>1</sub> (350 nM) were pre-incubated with L-Val-AMS **12**, L-Tyr-AMS **20**, and L-Pro-AMS **8** (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature, respectively. In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.0%. After 12 h at room temperature, these samples were reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5× SDS-loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

**Measurements of labeled *holo*-AusA<sub>1</sub> percentage by probe **27**:** Recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> (1 μM) was treated with probe **27** (1, 10, 20, 50, and 100 μM) for 12 h at room temperature in assay buffer. For inhibition studies, recombinant *holo*-AusA<sub>1</sub> (1 μM) was pre-incubated with L-Val-AMS **12** (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature. In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.0%. After 12 h at room temperature, these samples were reacted with Rh-azide for 1 h at room temperature. Reactions were treated with 5× SDS-loading buffer (strong reducing) and subjected to SDS-PAGE. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare). Protein labeling by probe **27** was quantitated by measuring integrated band intensities using ImageJ. A TAMRA-conjugated BSA (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1200 nM) (Thermo Fisher Scientific Inc.) was used as a standard of fluorescence intensity.

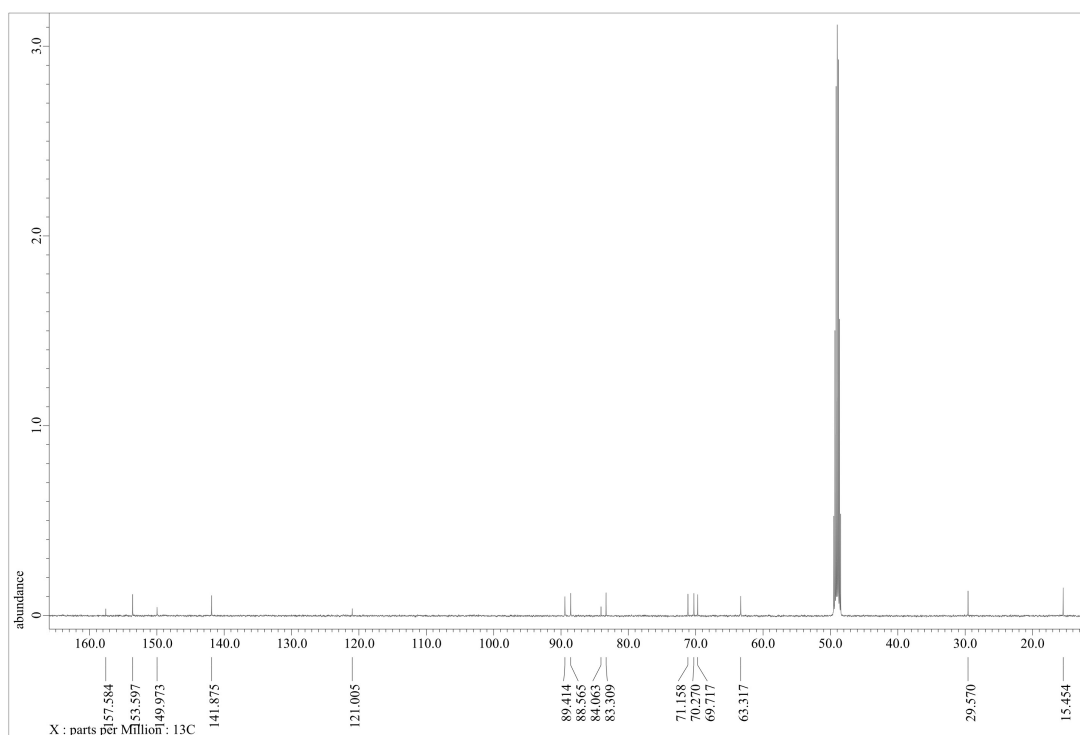
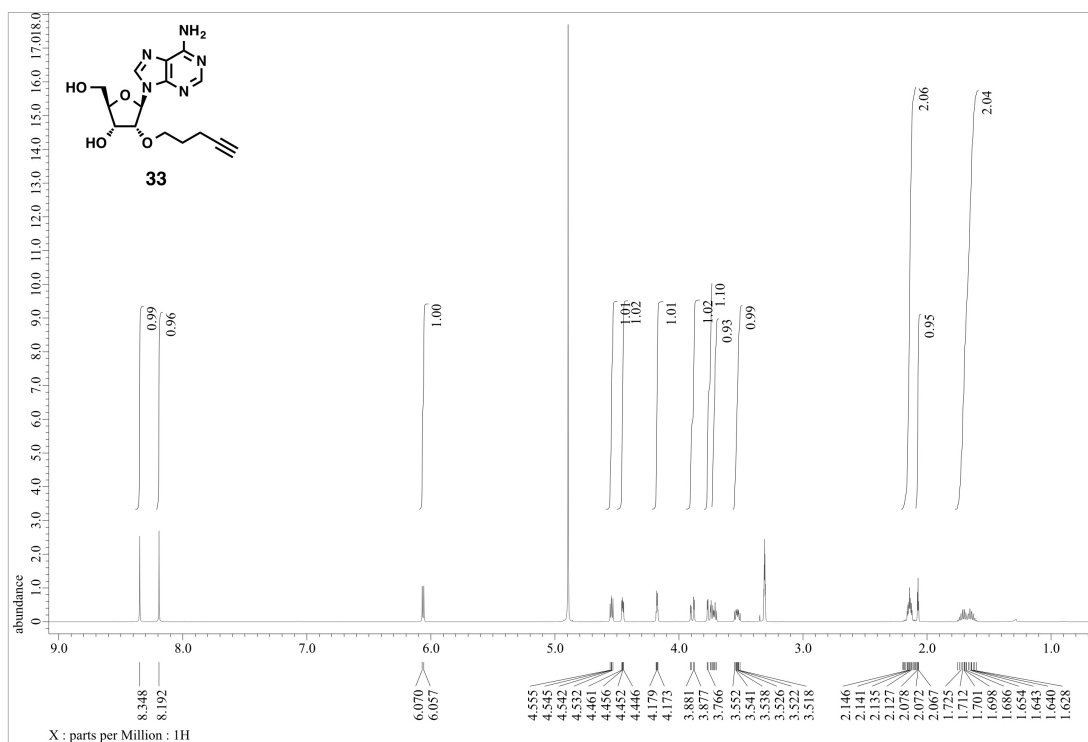
**SrfA-B labeling of *B. subtilis* ATCC 21332 proteomes:** *B. subtilis* proteome (2.0 mg/mL) was treated with probe **27** (100  $\mu$ M from a 10 mM stock in DMSO) in assay buffer. Inhibition studies were performed by pre-incubation of *B. subtilis* proteome (2.0 mg/mL) with L-Val-AMS **12** (1 mM from a 100 mM stock in DMSO) for 10 min at room temperature. In all experiments, the total DMSO concentration was kept at 2.0%. These reaction mixtures were incubated for the indicated time (0–12 h) at room temperature. These samples were reacted with Rh-azide for 1 h at 4 °C. Reactions were treated with 5 $\times$  SDS-loading buffer (strong reducing) and separated by gel electrophoresis. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

**Labeling of the CP-domain of SrfA-B in native proteomic environments:** *B. subtilis* ATCC 21332 proteome (2.0 mg/mL) was individually treated with L-Val-AMS **12**, L-Asp-AMS **22**, and L-Leu-AMS **13** (10  $\mu$ M or 5  $\mu$ M from a 10 mM stock in DMSO). These samples were incubated for 10 min at room temperature and subsequently reacted with probe **27** (100  $\mu$ M from a 10 mM stock in DMSO). In all experiments, total DMSO concentration was kept at 2.0%. After 12 h at room temperature, these mixtures were treated with Rh-azide for 1 h at either 4 °C or rt. Reactions were treated with 5 $\times$  SDS-loading buffer (strong reducing) and separated by gel electrophoresis. Fluorescent gel visualization was performed using a Typhoon 9410 Gel and Blot Imager (GE Healthcare).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) spectra of **32**

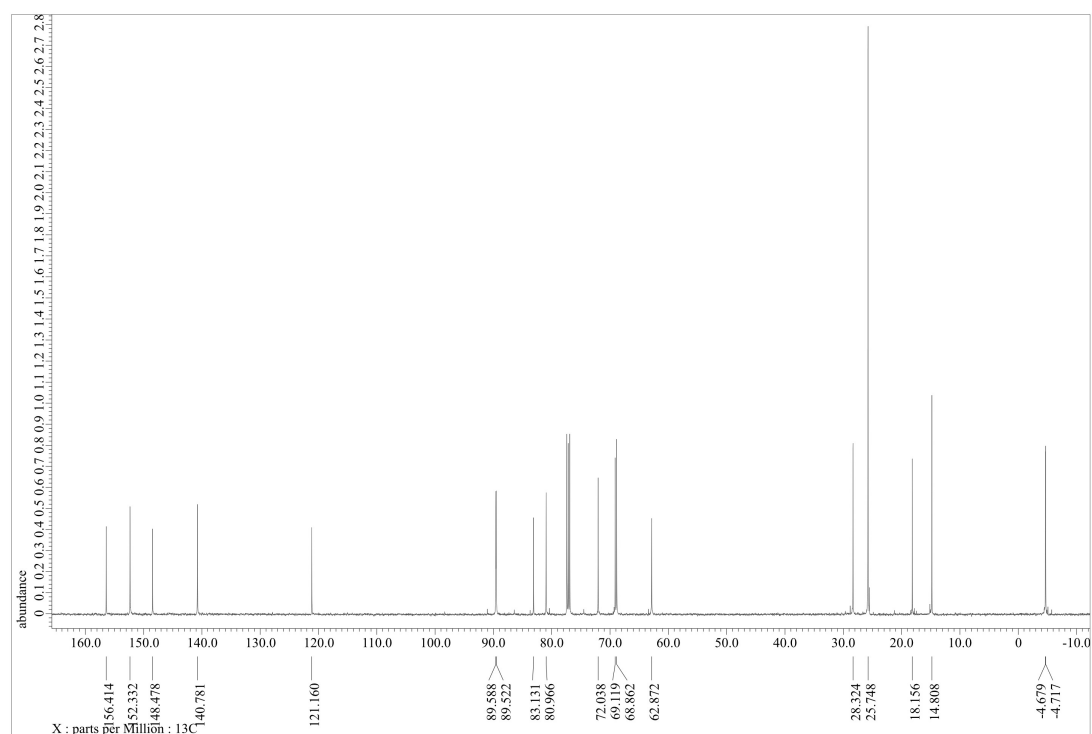
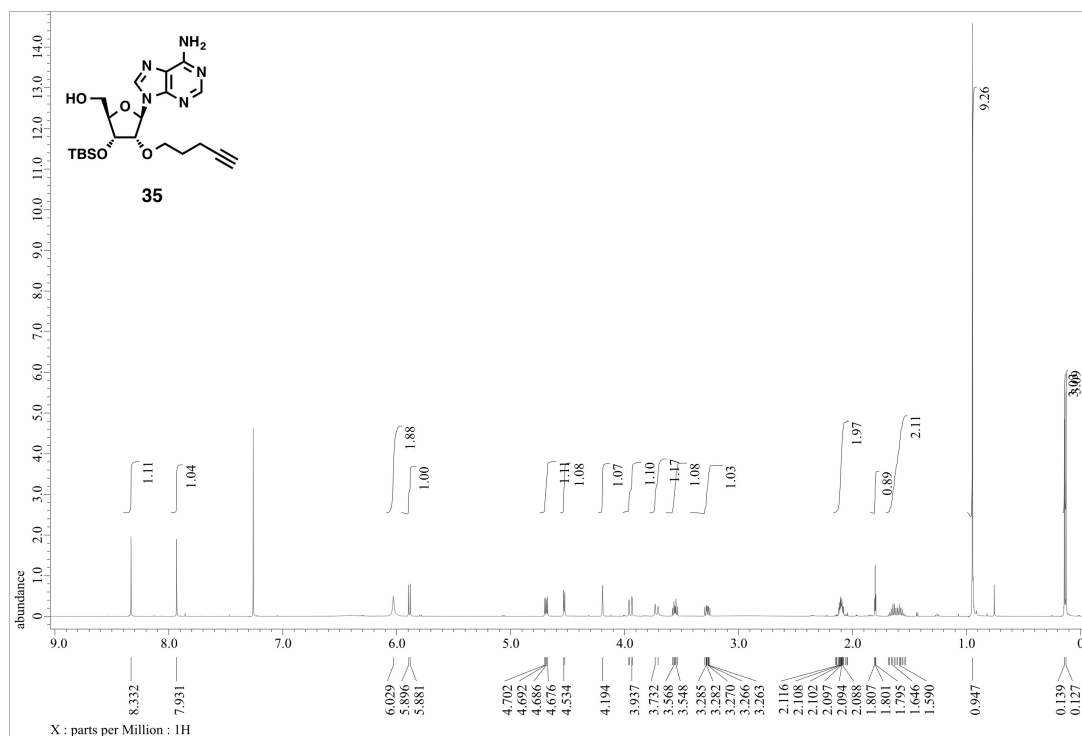


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **33**



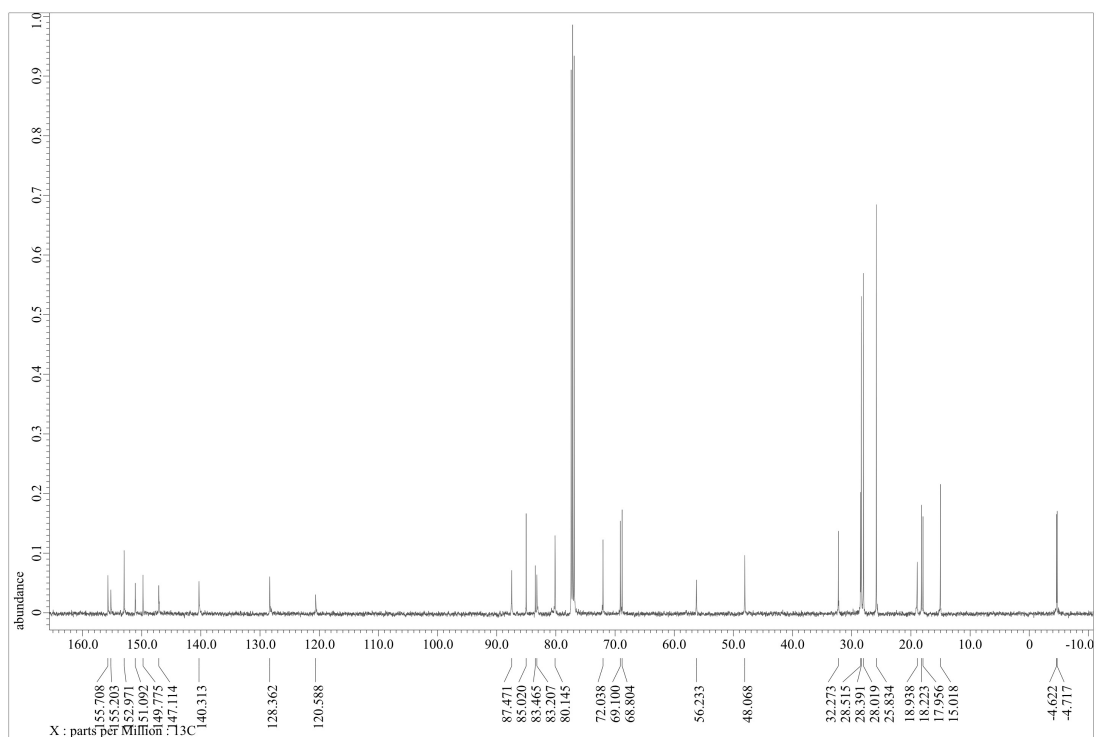
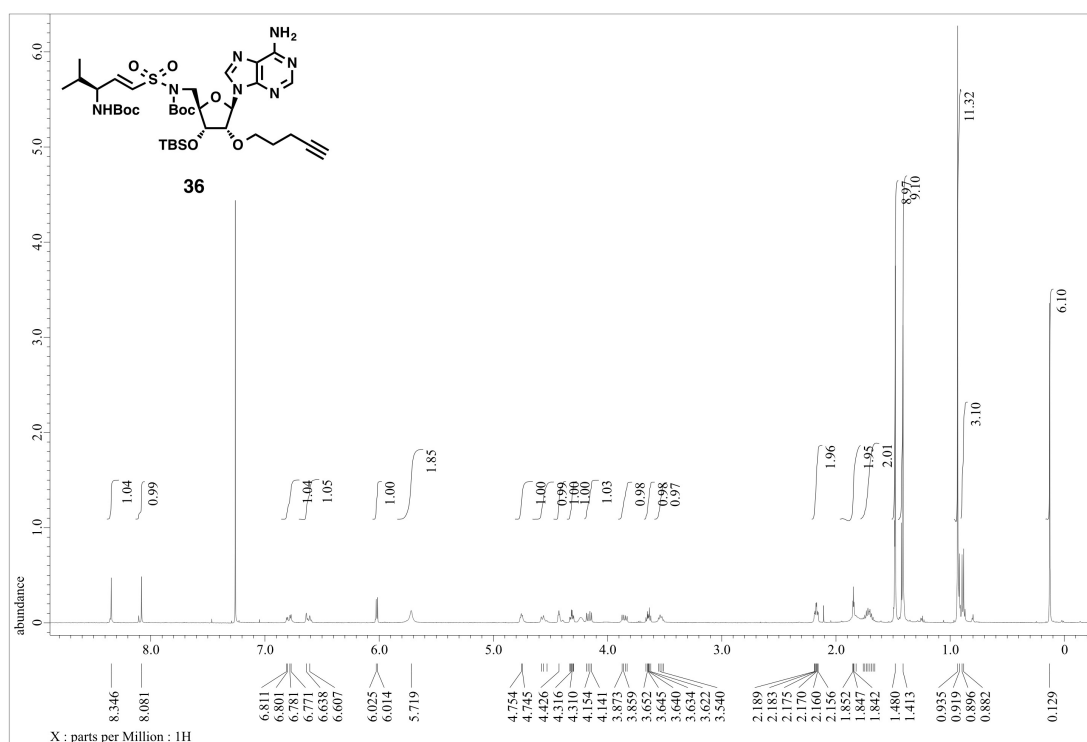


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **35**

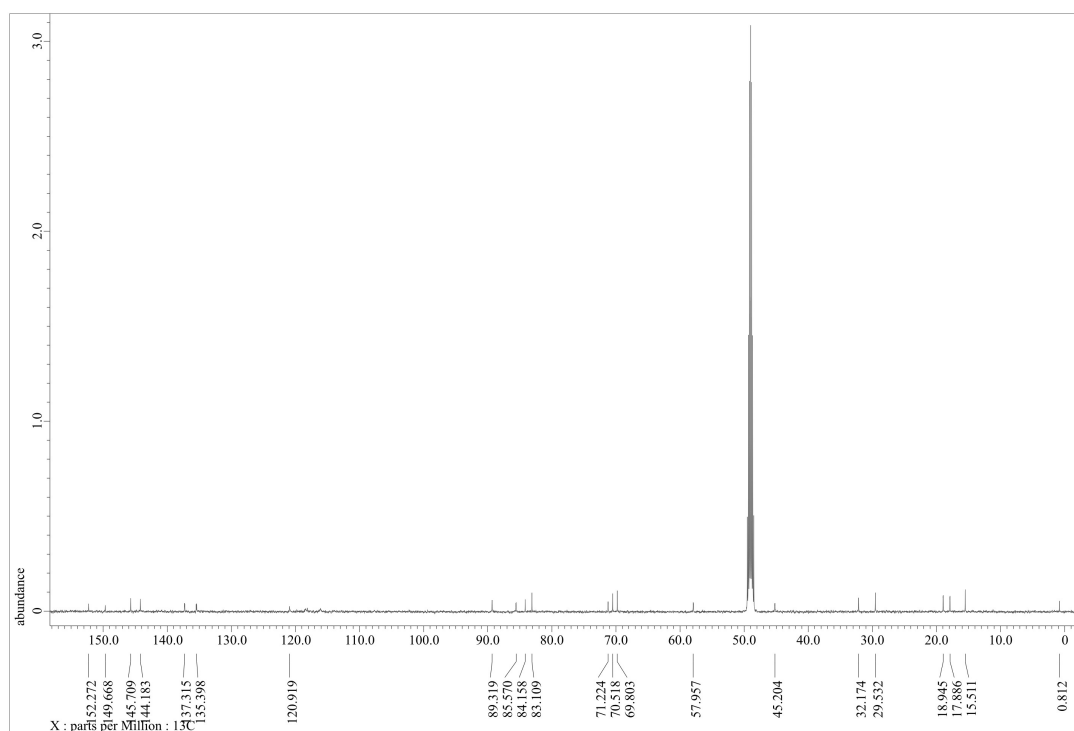
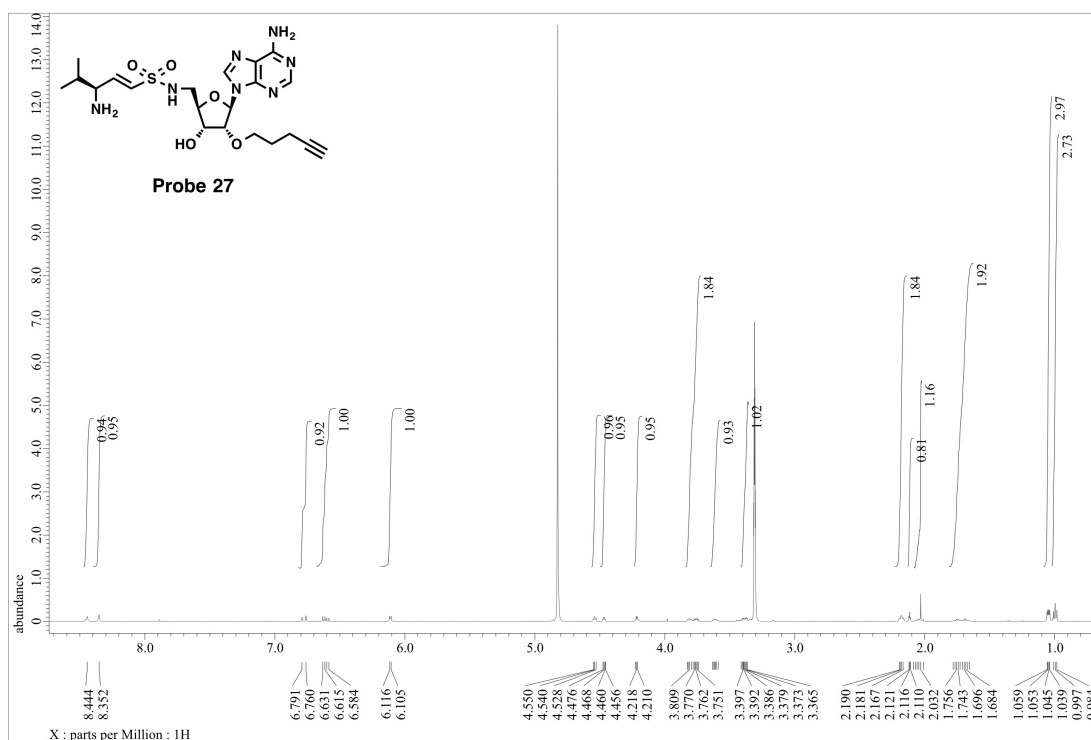




$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **36**



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) spectra of **27**



## 引用文献

1. C. T. Walsh, *Science*, **2004**, *303*, 1805.
2. D. Schwarzer, R. Finking, and M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275.
3. J. Clardy, M. A. Fischbach, and C. T. Walsh, *Nat. Biotech.* **2006**, *24*, 1541.
4. S. A. Survase, L. D. Kagliwal, U. S. Annapure, and R. S. Singhal. *Biotechnol Adv.* **2011**, *29*, 418.
5. D. Visaggio, M. Pasqua, C. Bonchi, V. Kaever, P. Visca, and F. Imperi. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 902.
6. J. Schalk, and L. Guillon. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 1661.
7. J. M. Tufariello, J. R. Chapman, C. A. Karantzas, K-W. Wong, C. Vilcheze, C. M. Jones, L. E. Cole, E. Tinaztepe, V. Thompson, D. Fenro, M. Niederweis, B. Ueberheide, J. A. Philips, and W. R. Jacobs Jr. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**, *113*, E348.
8. J. L. Meier and M. D. Burkart. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2012.
9. H. D. Mootz, D. Schwarzer, and M. A. Marahiel. *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 490.
10. U. Linne, A. Schafer, M. T. Stubbs, and M. A. Marahiel. *FEBS Letters*, **2007**, *581*, 905.
11. H. D. Mootz, R. Finking, and M. A. Marahiel. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37289.
12. N. P. Keller, G. Turner, and J. W. Bennett. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 937.
13. T. Stachelhaus, H. D. Mootz, and M. A. Marahiel. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493.
14. J. Micklefield, R. Lewis, L. Nunns, M. Al Nakeeb, M. Styles, A. W. Struck, C. P. Smith, and J. Micklefield. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7181.
15. H. Karis, R. Wachtel, A. Pabst, B. Wanner, D. L. Niquille, and D. Hilbert. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10105.
16. H. Karis, D. L. Niquille, and D. Hilvert. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 640.
17. S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, and R. D. Süßmuth. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5942.
18. S. G. Lee, and F. Lipmann. *Methods. Enzymol.* **1975**, *43*, 585.
19. H. Chen, B. K. Hubbard, S. E. O'Conner, and C. T. Walsh. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 103.
20. D. J. Wilson, and C.C. Aldrich, *Anal. Biochem.* **2010**, *404*, 56.

21. T. J. McQuade, A. D. Shallop, A. Sheoran, J. E. DelProposto, O. V. Tsodikov, and S. G-Tsodikova, *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 244.
22. P. C. Dorrestein, S. B. Bumpus, C. T. Calderone, S. G-Tsodikova, Z. D. Aron, P. D. Straight, R. Kolter, C. T. Walsh, and N. L. Kelleher, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 12756.
23. V. V. Phelan, Y. Du, J. A. McLean, and B. O. Bachmann, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 473.
24. B. F. Cravatt, A. T. Wright, and J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383.
25. S. Konno, F. Ishikawa, T. Suzuki, N. Dohmae, M. D. Burkart, and H. Kakeya, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2262.
26. K. Isono, M. Uramoto, H. Kusakabe, N. Miyata, T. Koyama, M. Ubukata, S. K. Sethi, and J. A. McClosey, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 670.
27. J. C-Pichel, M. T. G-Lópes, and F. G. De las Heras, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 383.
28. A. J. Pope, K. J. Moore, M. McVey, L. Mensah, N. Benson, N. Osbourne, N. Broom, M. J. B. Brown, and P. O'Hanlon, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31691.
29. A. K. Forrest, R. L. Jarvest, L. M. Mensah, P. J. O'Hanlon, A. J. Pope, and R. J. Sheppard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1871.
30. R. Finking, A. NeuMuller, J. Solsbcher, D. Konz, G. Kretzschemar, M. Schewettzer, T. Krumm, and M. A. Marahiel, *Chem. Bio. Chem.* **2003**, *4*, 903.
31. D. J. Wilson, C. Shi, A. M. Teitellbaum, A. M. Gulick, and C. C. Aldrich, *Biochemistry*, **2013**, *52*, 926.
32. G. L. Challis, J. Ravel, and C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 211.
33. L. Lou, G. Qian, Y. Xie, J. Hang, H. Chen, K. Z-Rivera, Y. Li, Y. Shen, P. H. Dussault, F. Liu, and L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 643.
34. G. Galli, R. Rodriguez, P. Cosmina, C. Pratesi, R. Nogarotto, F. de Ferra, and G. Grandi, *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1205*, 19.
35. A. Elsner, H. Engert, W. Saenger, L. Hamoen, G. Venema, and F. Bernhard, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4814.
36. M. A. Hassan, Y. I. EL-S. Kamal, R. Aziz, M. R. Sarmidi, and A. EI-E. Hesham, *Jurnal Teknologi*, **2012**, *59*, 101.

37. T. L. Foley, G. Rai, A. Yasgar, T. Daniel, H. L. Baker, M. A-Ramos, N. M. Kosa, W. Leister, M. D. Burkart, A. Jadhav, A. Simeonov, and D. J. Maloney, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1063.
38. M. Chu, R. Mierzewa, L. Xu, S-W. Yang, L. He, M. Patel, J. Stafford, D. Macinga, T. Black, T-M. Chan, and V. Gullo, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *13*, 3827.
39. A. M. Gilbert, M. Kirisits, P. Toy, D. S. Nunn, A. Failli, E. G. Dushin, E. Novikova, P. J. Petersen, D. J-McCarthy, I. McFadyen, and C. C. Fritz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 37.
40. T. L. Foley, B. S. Young, and M. D. Burkart, *FEBS J.* **2009**, *276*, 7134.
41. T. Stachelhaus, A. Hüser, and M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 913.
42. J. Vater, N. Mallow, S. Gerhardt, A. Gadow, and H. Kleinkauf, *Biochemistry*, **1985**, *24*, 2022.
43. D. J. Prescott, J. Elovson, and P. R. Vagelos, *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 4517.
44. N. M. Kosa, R. W. Haushalter, A. R. Smith, and M. D. Burkart, *Nat. Methods*, **2012**, *9*, 981.
45. J. J. La Chair, T. L. Foley, T. R. Schegg, C. M. Regan, and M. D. Burkart, *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 195.
46. J. J. Reddick, J. Cheng, and W. R. Roush, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1967.
47. F. Ishikawa, K. Miyamoto, S. Konno, S. Kasai, H. Takeya, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2816.
48. D. C. Reuter, J. E. McIntosh, A. C. Guinn, and A. M. Madera, *Synthesis*, **2003**, *15*, 2321.
49. D. A. Keire, E. Strauss, W. Guo, B. Noszal, and D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 123.
50. N. S. Shaligram, and R. S. Singhal, *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, *48*, 119.
51. M-S. Yeh, Y-H. Wei, and J-S. Chang, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1329.
52. J. Neres, N. P. Labello, R. V. Somu, H. I. Boshoff, D. J. Wilson, J. Vannada, L. Chen, C. E. Barry III, E. M. Bennett, and C. C. Aldrich, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5349.
53. H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
54. W. C. Still, M. Kahn, and A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
55. P. Brown, C. M. Richardson, L. M. Mensah, P. J. O'Hanlon, N. F. Osborne, A. j. Pope, and G. Walker, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2473.

56. T. Stachelhaust, H. D. Mootz, V. Bergendahl, and M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22773.
57. F. Ishikawa, and H. Kakeya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 865.
58. C. C. Matteo, M. Glade, A. Tanaka, J. Piret, and A. L. Demain, *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, *17*, 129.
59. D. C. Augenstein, K. Thrasher, A. J. Shinsky, and D. I. C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, *16*, 1433.
60. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
61. M. R. Rivero, I. Alonso, and J. C. Carretero, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5443.
62. J. W. Skiles, C. Miao, R. Sorcek, S. Jacober, P. W. Mui, G. Chow, S. M. Weldon, G. Possanza, and M. Skoog, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4795.
63. H. D. Mootz, and M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6843.
64. R. Haushalter, A. S. Worthington, G. H. Hur, and M. D. Burkart, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3039.

## 謝辞

本研究は京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムケモセラピー・制御分子学分野において掛谷秀昭教授の下で行ったものであります。修士課程から5年間に渡る御指導と御鞭撻を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科 石濱泰教授、並びに大野浩章教授には本博士論文を査読していただき多くの御教示を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

博士後期過程から公私に渡り常に貴重な御意見や大変熱心な御指導をくださいました京都大学学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット 石川文洋特定助教に大変厚く御礼申し上げます。

研究の御指導や御意見賜りました京都大学大学院薬学研究科 服部明准教授、並びに西村慎一助教に深謝いたします。

同じ博士課程の学生として、また先輩として研究の御指導や御意見下さり支えて頂いた今野翔氏に深謝いたします。

タンパク質試料の解析をして頂いた理化学研究所環境資源研究センター生命分子解析ユニットユニットリーダー 堂前直博士、並びに鈴木健裕技師に深謝いたします。また、タンパク質発現ベクターを供与していただきました Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel (Philipps-Universität Marburg)、並びに Prof. Dr. Michael D. Burkart (University of California, San Diego) に深謝いたします。

掛谷研究室において AusA<sub>1</sub> および AusA<sub>2</sub> のタンパク質発現ベクターの構築を行って頂いた杉本泰康修士、並びに宮本健吾修士に深謝いたします。また、共に研究に励んだ研究室の皆様に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり研究助成をして頂いた財団法人 上尾竹圓会に感謝いたします。

最後に、これまで私の意志を尊重し、進学及び研究を行う機会を与えてくれた両親、並びに家族の理解と協力を心から感謝します。

2016年3月 笠井 昭太