

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4340423号
(P4340423)

(45) 発行日 平成21年10月7日 (2009. 10. 7)

(24) 登録日 平成21年7月10日 (2009. 7. 10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 8 B 37/08 (2006. 01)

C O 8 B 37/08 Z

C O 8 B 37/10 (2006. 01)

C O 8 B 37/10

G O 1 N 33/532 (2006. 01)

G O 1 N 33/532 A

G O 1 N 33/566 (2006. 01)

G O 1 N 33/566

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2002-180539 (P2002-180539)
 (22) 出願日 平成14年6月20日 (2002. 6. 20)
 (65) 公開番号 特開2004-18841 (P2004-18841A)
 (43) 公開日 平成16年1月22日 (2004. 1. 22)
 審査請求日 平成17年6月10日 (2005. 6. 10)

(73) 特許権者 000195524
 生化学工業株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
 (74) 代理人 100124512
 弁理士 堀口 努
 (72) 発明者 杉浦 信夫
 岐阜県羽島郡岐南町石原瀬1丁目43の5
 (72) 発明者 高木 秀和
 愛知県尾張旭市庄中町塚坪2114 ドリ
 ームステージ21 301号
 (72) 発明者 木全 弘治
 愛知県名古屋市名東区社口2-102-1
 エスポア社口1201

審査官 福井 悟

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光反応性糖化合物および標識化光反応性糖化合物ならびに糖受容体の捕捉および測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式で表される光反応性糖化合物。

A - X - Y

A : リン脂質

X : グリコサミノグリカンまたはそのオリゴ糖

Y : フェニルアジド基を有する光反応性化合物残基

A - X の - : 酸アミド結合又はアミノアルキル結合

X - Y の - : エステル結合又はアミド結合

【請求項 2】

グリコサミノグリカンまたはそのオリゴ糖がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸およびこれらのオリゴ糖からなる群から選択される請求項 1 に記載の光反応性糖化合物。

【請求項 3】

リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである請求項 1 又は 2 に記載の光反応性糖化合物。

【請求項 4】

X と Y がジスルフィド結合を有するスペーサー基を介して結合している請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

【請求項 5】

10

20

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の光反応性糖化合物とビオチン、蛍光物質、ラジオアイソトープ、抗体、蛍光蛋白質又は発光蛋白質である標識化合物の残基とが結合した標識化光反応性糖化合物。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の標識化光反応性糖化合物を含む光反応性標識試薬。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の光反応性糖化合物を固着した固相と、糖受容体とを接触させて光反応性糖化合物と糖受容体を結合させ、次いで光を照射し、該光反応性糖化合物の光反応性化合物残基と該糖受容体を結合することによって該糖受容体を固相に捕捉することを特徴とする糖受容体の捕捉方法。

10

【請求項 8】

請求項 5 に記載の標識化光反応性糖化合物を固着した固相と、糖受容体とを接触させて該標識化光反応性糖化合物と糖受容体を結合させ、次いで光を照射し、該標識化光反応性糖化合物の光反応性化合物残基と該糖受容体を光反応により結合させることによって該糖受容体を固相に捕捉すると共に標識化し、標識化された該受容体を固相に結合した状態または固相から遊離させた後に検出することを特徴とする糖受容体の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な光反応性糖化合物および糖親和性分子解析用プローブとしての用途を有する標識化光反応性糖化合物ならびにこれらを用いる糖受容体の捕捉方法および測定方法に係わるものである。

20

【0002】

【従来技術】

光反応性標識化合物は、薬物あるいはリガンドと蛋白質との相互作用を解析できる有用なプローブとして知られている。蛋白質を光反応により標識する反応基としてはアジド基が知られている。光反応性基としてアジド基を有する光反応性化合物と糖化合物からなる光反応性糖化合物としては、ヒアルロン酸、S A S D (Sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionate) 及びラジオアイソトープ [^{125}I] からなる光反応性糖化合物 (Glycobiology, vol.7 no.1 pp.15-21, 1997) や、オリゴ糖、S A N P A H (N-Succinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoate) 及びジゴキシンからなる光反応性糖化合物 (Glycobiology vol.10 no.4 pp.357-364, 2000) などが知られており、蛋白質やレクチンの標識に用いられている。しかしながら、糖化合物に脂質が結合した脂質結合糖化合物に光反応性基が結合した光反応性糖化合物は知られておらず、また、該光反応性糖化合物を固相に固定化することにより、目的の糖受容体を簡単に標識、分離させようとする試みは未だなされていない。

30

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、糖と相互作用しうる蛋白質 (糖受容体) などの生体高分子の機能や構造を研究するうえでの有用性を有する光反応性糖化合物および標識化光反応性糖化合物を提供することを目的とする。本発明の更なる目的は、光反応性糖化合物による糖受容体の捕捉方法及び標識化光反応性糖化合物を用いる糖受容体の測定方法を提供することにある。

40

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記実状に鑑み鋭意検討を重ねた結果、目的の糖受容体を簡単に標識、分離することができる光反応性糖化合物および標識化光反応性糖化合物を製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下の通りである。

【0005】

〔1〕下記式で表される光反応性糖化合物。

50

A - X - Y

A : 脂質

X : 糖化合物

Y : 光反応性化合物残基

- : 共有結合

〔 2 〕 Xで示される糖化合物がヒドロキシル基、アミノ基および／またはカルボキシル基を有する多糖またはオリゴ糖である〔 1 〕に記載の光反応性糖化合物。

〔 3 〕 ヒドロキシル基、アミノ基および／またはカルボキシル基を有する多糖またはオリゴ糖がグリコサミノグリカンまたはそのオリゴ糖である〔 2 〕に記載の光反応性糖化合物。

〔 4 〕 グリコサミノグリカンまたはそのオリゴ糖がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸およびこれらのオリゴ糖からなる群から選択される〔 3 〕に記載の光反応性糖化合物。

〔 5 〕 Aで示される脂質がリン脂質である〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

〔 6 〕 リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである〔 5 〕に記載の光反応性糖化合物。

〔 7 〕 Yで示される光反応性化合物残基がアジド基、ジアゾ基およびジアジリン基からなる群から選択される光反応性基を有する光反応性化合物の残基である〔 1 〕～〔 6 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

〔 8 〕 Yで示される光反応性化合物残基が光反応性基としてアリアルアジド基を有する光反応性化合物残基である〔 1 〕～〔 7 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

〔 9 〕 XとYがエステル結合またはアミド結合によって結合している〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

〔 10 〕 XとYがジスルフィド結合を有するスペーサー基を介して結合している〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物。

〔 11 〕 〔 1 〕～〔 10 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物と標識化合物残基が結合した標識化光反応性糖化合物。

〔 12 〕 〔 11 〕 記載の標識化光反応性糖化合物を含む光反応性標識試薬。

〔 13 〕 〔 1 〕～〔 10 〕のいずれかに記載の光反応性糖化合物を固着した固相と、糖受容体とを接触させて光反応性糖化合物と糖受容体を結合させ、次いで光を照射し、該光反応性糖化合物の光反応性化合物残基と該糖受容体を結合することによって該糖受容体を固相に捕捉することを特徴とする糖受容体の捕捉方法。

〔 14 〕 〔 11 〕 記載の標識化光反応性糖化合物を固着した固相と、糖受容体とを接触させて該標識化光反応性糖化合物と糖受容体を結合させ、次いで光を照射し、該標識化光反応性糖化合物の光反応性化合物残基と該糖受容体を光反応により結合させることによって該糖受容体を固相に捕捉すると共に標識化し、標識化された該受容体を固相に結合した状態または固相から遊離させた後に検出することを特徴とする糖受容体の測定方法。

【 0006 】

【 発明の実施の形態 】

以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。

本発明の光反応性糖化合物は、糖化合物（X）に脂質（A）が結合した脂質結合糖化合物（A - X）と、これに結合した光反応性化合物残基（Y）よりなる。

すなわち、本発明の光反応性糖化合物は、下記一般式で示される。

【 0007 】

A - X - Y

【 0008 】

本発明の光反応性糖化合物を構成する糖化合物としては、ヒドロキシル基、アミノ基および／またはカルボキシル基を有する多糖、オリゴ糖が挙げられ、例えば、ムチン型糖鎖、Asn型糖鎖、シアリル糖鎖、グリコサミノグリカン、ラクトサミン、N - アセチルラク

10

20

30

40

50

トサミン、ラクトサミンオリゴ糖、シアリルラクトサミン、グルカン、マンナン、フルクタン、ガラクトン、ポリウロン酸、オリゴアミノ糖、ポリアミノ糖、ガラクトオリゴ糖などが挙げられ、その中でも特にグリコサミノグリカンが好ましい。グリコサミノグリカンは、D-グルコサミン又はD-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸および/またはD-ガラクトースとの二糖の繰り返し単位を基本骨格として構成される多糖であり、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的若しくは酵素的に合成されたもの等のいずれも光反応性糖化合物の合成に使用することができる。具体的には例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K等）、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン及びその誘導体などが挙げられ、特にコンドロイチン硫酸が好ましいが、これらに限定されるものではない。コンドロイチン硫酸の分子量は、一般に1,000~1,000,000程度であるが、約2,000~200,000程度が好ましく、特に約3,000~100,000が好ましい。また、糖化合物は上記グリコサミノグリカンのオリゴ糖でもよく、化学的分解により製造したもの、糖分解酵素を用いて製造したもの等いずれも光反応性糖化合物の合成に使用することができる。

10

【0009】

前述の糖化合物に結合させる脂質としては、動物、植物、微生物などの天然物由来、又は化学的もしくは酵素的に合成若しくは部分的に分解された複合脂質又は単純脂質を使用することができ、リン脂質等のグリセロ脂質、長鎖の脂肪酸、長鎖の脂肪族アミン、コレステロール類、スフィンゴ脂質、セラミド等いずれも使用することができる。特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジレイノシトール等のリン脂質、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の中性脂質等のグリセロ脂質が好ましい。これらのうち、リン脂質が特に好ましく、その中でもホスファチジルエタノールアミンが更に好ましい。アシル基を有する脂質中のアシル基の鎖長及び不飽和度は特に限定されないが、炭素数6以上のものが好ましい。アシル基としては例えばパルミトイル（ヘキサデカノイル）又はステアロイル（オクタデカノイル）などが例示される。

20

【0010】

また、本発明の光反応性糖化合物の合成に際し、これらの脂質は遊離型であっても、通常使用される塩型であってもよい。

30

糖化合物と脂質との結合位置は特に限定されるものではないが、糖化合物の末端部が好ましく、特に還元末端への結合が好ましい。また、結合の態様は特に限定されないが、特に化学結合が好ましく、その中でも共有結合による結合が最も好ましい。

【0011】

グリコサミノグリカンと脂質とが結合した脂質結合グリコサミノグリカンの場合、グリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラク톤を含む）、アルデヒド基（ヘミアセタール基を含む）、ヒドロキシル基若しくは1級アミノ基等の官能基、又はグリコサミノグリカンに別途導入された前記官能基と、脂質のカルボキシル基、アルデヒド基若しくは1級アミノ基等の官能基、または脂質に別途導入された前記官能基との間で形成される酸アミド結合（-CO-NH-）、エステル結合又はアミノアルキル結合（-CH₂-NH-）によって共有結合したものが好ましい。

40

【0012】

特に、グリコサミノグリカンの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラク톤を含む）と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（-CO-NH-）、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（-CO-NH-）、又はグリコサミノグリカンの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたグリコサミノグリカンのアルデヒド基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成されたシッフ塩基を還元して形成されたアミノアルキル結合

50

($-\text{CH}_2-\text{NH}-$)により結合されたもの、あるいはグリコサミノグリカンの還元末端(ヘミアセタール)のアルデヒド基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された Schiff 塩基を還元して形成されたアミノアルキル結合($-\text{CH}_2-\text{NH}-$)により結合されたものが好ましい。

【0013】

なお、上記共有結合に関与するアミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基(ヘミアセタール基を含む)、ヒドロキシル基はグリコサミノグリカン又は脂質に元来存在するもの、これらに化学的処理を施すことによって形成されたもの、或いは上記官能基を末端に有するスペーサー化合物を、予めグリコサミノグリカン又は脂質と反応させることによって別途導入されたもののいずれであってもよい。

10

【0014】

脂質結合糖化合物の製造法は、所望の構造の化合物を合成できる方法である限り限定されるものではないが、公知の方法によって製造することができる。例えば、脂質がグリコサミノグリカンの還元末端に共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンの製造法としては、例えば、還元末端限定酸化法、還元末端ラクトン法(特許第2997018号公報、特許第2986519号公報、特許第2986518号公報及び特開平9-30979号公報)またはヘミアセタール法(特願2002-143898, 特許出願中)等が挙げられる。

【0015】

本発明の光反応性化合物残基としては、アジド基(アルキルアジド、アリールアジド及びニトロフェニルアジド等)、ジアゾ基(ジアゾケトン、ジアゾアセチル、ジアゾマロニル、トリフルオロメチルジアゾアセチル及びp-トルエンスルホニルジアゾアセチル等)、ジアジリン基(アリールジアジリン等)等の光反応性基を有する光反応性化合物残基が挙げられ、この中でも光反応性基としてアジド基、好ましくはアリールアジド、より具体的にはフェニルアジド基を有する光反応性化合物残基が好ましい。

20

【0016】

本発明の光反応性糖化合物を合成するためには、通常、A-Xで表される脂質結合糖化合物を合成し、次いでこれに上記光反応性基を有する光反応性化合物を反応させるが、合成が可能である限り他の方法、例えば、糖化合物に光反応性化合物を反応させてX-Yを合成し、これに脂質を反応させて光反応性糖化合物を合成してもよい。

【0017】

本発明の光反応性糖化合物において脂質結合糖化合物の糖部分と光反応性化合物残基とは、エステル結合またはアミド結合により結合していることが好ましい。その結合方法としては、糖部分のヒドロキシル基またはアミノ基に光反応性化合物の活性エステルを反応させる方法(活性エステル法)、糖部分にウロン酸が含まれる場合、該ウロン酸のカルボキシル基と光反応性化合物のアミノ基とをカルボジイミド類などの縮合剤により縮合させる方法、糖部分のウロン酸のカルボキシル基を活性エステル、酸アジドまたはカルボキシクロリドのような活性型とし、光反応性化合物のアミノ基と縮合させる方法、糖部分がN-アセチルヘキソサミンを含む場合、N-アセチルヘキソサミンにヒドラジンを作用させ、アセチル基を遊離させてアミノ基とし、前記活性エステル法もしくは縮合剤により縮合させる方法等が挙げられる。

30

40

【0018】

上記合成反応に用いる光反応性化合物は、上記光反応性基を有する化合物であれば市販の光反応性試薬でよく、例えば、スルホスクシンイミジル(4-アジド-サリチルアミド)ヘキサノエート(Sulfosuccinimidyl(4-azido-salicylamido)hexanoate, 商品名:Sulfo-NHS-LC-ASA)、スルホスクシンイミジル(4-アジド-フェニルジチオ)プロピオネート(Sulfosuccinimidyl(4-azido-phenylthio)propionate, 商品名:Sulfo-SADP)、スルホスクシンイミジル6-(4-アジド-2-ニトロフェニルアミノ)-ヘキサノエート(Sulfosuccinimidyl6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoate, 商品名:Sulfo-SANPAH)、スルホスクシンイミジル-2-[6-(ピオチンアミド)-2-(p-アジドベンズアミド)-ヘキサノアミド]エチル-1,3-ジチオプロピオネート(Sulfos

50

uccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionate、商品名：Sulfo-SBED)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate、商品名：Sulfo-HSAB)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid、商品名：NHS-ASA)、N-スクシンイミジル(4-アジド-フェニル)1,3'-ジチオプロピオネート(N-Succinimidyl(4'-azido-phenyl)1,3'-dithiopropionate、商品名：SADP)、スルホスクシンイミジル2-[7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド]エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(Sulfosuccinimidyl2-[7-azido-4-methylcoumarin-3-acetamido]ethyl-1,3'-dithiopropionate、商品名：SAED)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)エチル1,3'-ジチオプロピオネート(Sulfosuccinimidyl-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)ethyl1,3'-dithiopropionate、商品名：SAND)、N-スクシンイミジル-6-(4-アジド-2-ニトロフェニルアミド)ヘキサノエート(N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate、商品名：SANPAH)、スルホスクシンイミジル2-(p-アジド-サリシルアミド)エチル1,3'-ジチオプロピオネート(Sulfosuccinimidyl2-(p-azido-salicylamido)ethyl1,3'-dithiopropionate、商品名：SASD)、スルホスクシンイミジル(パーフルオロアジドベンザミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(Sulfosuccinimidyl(perfluoroazidobenzamido)ethyl-1,3'-dithiopropionate、商品名：SFAD)、p-アジドベンゾイルヒドラジド(p-Azidobenzoyl hydrazide、商品名：ABH)、N-5-アジド-2-ニトロベンジルオキシ-スクシンイミド(N-5-Azido-2-nitrobenzyloxy-succinimide、商品名：ANB-NOS)、4-(p-アジドサリチルアミド)-ブチルアミン(4-(p-Azidosalicylamido)-butylamine、商品名：ASBA)、ビオチン-N-Boc-フェニルアミノジアジリン(Biotin-N-Boc-phenylaminodiazirin、商品名：アフィライト-CHO)などが挙げられる。この中でも特にスルホスクシンイミジル-2-[6-(ビオチンアミド)-2-(p-アジドベンズアミド)-ヘキサノアミド]エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionate、商品名：Sulfo-SBED)が好ましい。

【0019】

本発明の光反応性糖化合物を標識化することにより、糖受容体の微量検出とアフィニティ精製を同時に行うことができる。

光反応性糖化合物を標識化するためには、ビオチン、蛍光物質、ラジオアイソトープ、抗体、GFPなどの蛍光蛋白質、ルシフェリンなどの発光蛋白質などを用いることができ、この中でも特にビオチンが好ましい。

【0020】

光反応性糖化合物と標識化合物との結合方法は、あらかじめ光反応性試薬に標識化合物残基を結合させておく方法(Bioconjugate Techniques, pp.289-291 Academic Press, 1994)、糖残基あるいは光反応性化合物残基に蛍光物質を結合させる方法(Carbohydr. Res., 105, 69-85, 1982)、光反応性化合物中のヒドロキシフェニル(hydroxyphenyl)残基にラジオアイソトープ¹²⁵Iを結合させる方法(Glycobiology, vol.7 no.1 pp.15-21, 1997)、糖残基に¹²⁵Iを結合させる方法(Anal. Biochem., 139, 168-177, 1984)、光反応で結合させる蛋白質分子(糖受容体)をあらかじめ遺伝子工学的に蛍光蛋白質や発光蛋白質との融合蛋白質として調製しておく方法、あるいは化学的に蛍光蛋白質や発光蛋白質を結合させておく方法、などが挙げられる。また、糖化合物自体を標識化合物として扱うことも可能である。すなわち、糖化合物特異的に認識する特異抗体(ポリクローン抗体やモノクローン抗体)や糖結合分子(レクチンやヘパリン結合性サイトカイン、ヒアルロン酸結合性蛋白質など)を用いて光反応性糖化合物を認識する方法なども挙げられる。

【0021】

また、光反応性糖化合物において、糖化合物と光反応性化合物とはジスルフィド結合を有するスペーサーを介して結合していることが好ましい。より具体的には、NH-(CH₂)_n-S-S-(CH₂)_m-CO-〔式中、n,mは1~8の整数〕で示されるスペーサーを介し、該スペーサー

のNH-が光反応性化合物に由来するCO-とアミド結合し、CO-が糖化合物に由来するOH-またはNH₂-と結合していることが好ましい。ジスルフィド結合を有するスペーサーを導入することにより、光反応性糖化合物と糖受容体を親和性により結合させた後、ジチオスレイトール等のジスルフィド結合を開裂させる物質を作用させることにより、糖部分と結合した糖受容体を遊離させることができる。

【0022】

本発明の光反応性標識試薬は、本発明の標識化光反応性糖化合物を主成分として含み、該試薬はこの化合物の機能を害さない限り、水、緩衝剤、安定化剤、塩等の添加物を含んでいてもよい。

【0023】

本明細書において「光反応性標識試薬」とは、糖受容体に親和性を有する光反応性糖化合物を含む標識試薬を意味するものとし、糖受容体とは糖化合物と親和性を有する、すなわち、糖化合物との特異的な相互作用により糖化合物に結合性示す蛋白質を意味し、具体的には糖化合物に特異的なレクチン、受容体、酵素、抗体などを包含する。

また、本発明の標識化光反応性糖化合物を用いて糖受容体を標識する方法は以下の通りである。

【0024】

すなわち、本発明の標識化光反応性糖化合物をプラスチックプレート、プラスチックビーズおよび多孔性担体等の固相に固着し、種々の糖受容体を含む混合系と接触させることにより、糖受容体と糖化合物との特異的相互作用によって両者を結合させる。その結合反応と同時に又はその後、光を照射し、光反応により、光反応性糖化合物の糖部分に特異的に相互作用する糖受容体のアミノ酸残基側鎖や末端アミノ基あるいは末端カルボキシル基と、該光反応性糖化合物の光反応性基とがラジカル反応で結合し、糖受容体を標識することができる。

【0025】

上記の方法により標識した糖受容体は、糖受容体に結合した標識化光反応性糖化合物を検出する自体公知の検出系、例えば、パーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを用いた酵素免疫測定法(ELISA)様のビオチン検出系、標識ラジオアイソトープを検出するシンチレーションカウンターやガンマカウンター、蛍光物質や発光物質を検出する蛍光検出機やルミノメーター、糖化合物に特異的に反応する抗体や糖結合分子を使ったELISA様の糖鎖検出系などによって高感度で検出することができる。また、標識した糖受容体をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動などで分離し、ウエスタンブロッティングして、上記各種検出系により糖受容体を識別することが出来る。

【0026】

更に、糖化合物と光反応性化合物残基の結合は解離可能な結合、例えばスペーサー部位にジスルフィド結合を存在させることにより、糖化合物部分を容易に解離することができる。解離する手段としては、例えば、ジチオスレイトールやメルカプトエタノールなどのチオール試薬で処理する方法などが挙げられる。

なお、解離可能な結合を有しない場合においても、糖化合物分解酵素を用いることにより、糖化合物部分を容易に切り離すことができる。

【0027】

本発明の光反応性標識試薬は、糖受容体等の糖鎖関連蛋白質の構造及び機能解析に極めて有用なプローブ又は精製手段となることが期待される。

【0028】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

(参考例1)

コンドロイチン硫酸C-ホスファチジルエタノールアミン結合体(CSC-PE)の合成
サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸C(CSC)ナトリウム塩(生化学工業(株)製、平均

10

20

30

40

50

分子量：20,000) 2.0 g を蒸留水 100 ml に溶解し、Dowex 50W-X8 (室町化学社製、H⁺form) カラム (2.5cm x 6.5cm) にアプライし、ナトリウム塩フリーとなった通過液を氷浴上で集め、更に 100 ml の蒸留水を流し洗浄液として一緒に集めた。通過液集積開始から pH をモニターし、テトラブチルアンモニウム (But₄N⁺) 水溶液を添加し、pH を弱酸性から中性に調整した。その溶液 (約 200 ml) をロータリーエバポレーターで約 100 ml まで減圧濃縮し、室温で 3 日間凍結乾燥して、CSC・But₄N⁺ 塩を乾燥粉末として得た。この時の収率はほぼ定量的であった。

【0029】

その乾燥粉末を脱水メタノール 50 ml に溶解し、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (PE) 208 mg (300 μmol) の脱水メタノール溶液 50 ml を添加した。窒素雰囲気下、50℃で 1 時間攪拌した後、トリメチルアミンボラン複合体 ((CH₃)₃N・BH₃) 73.0 mg を加え、更に 50℃で攪拌を続けた。(CH₃)₃N・BH₃ を更に (73 mg ずつ) 2 回 (24 時間おき) 添加し、50℃で 3 日間反応させた。

【0030】

反応液を減圧濃縮後、メタノールを加え減圧濃縮を繰り返し、その残渣に 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液 40 ml を加えた。室温で約 2 時間攪拌した後、遠心分離 (6,000 rpm、30 分以上) により不溶物を除去し、その上清に酢酸ナトリウム飽和エタノールを 3 倍容 (120 ml) 加えて 4℃で 2 時間以上置き、生成した沈殿を遠心分離 (4,600 rpm、30 分以上) により集めた。その沈殿を乾燥させずに、水 50 ml およびメタノール 50 ml を加え、溶解させた。その溶液にブチルセルロファイン type H (生化学工業 (株) 製) ゲル 5 g を添加した。その懸濁液をゆっくりと攪拌しながら、1 M 食塩水 (20 ml) をゆっくり滴下して、反応生成物を吸着させた。4℃で 2 時間攪拌後、カラム (2.5cm x 8.0cm) に充填した。溶液を抜き、0.2 M 食塩水 200 ml で洗浄した後、蒸留水 50 ml および 30% (v/v) メタノール - 蒸留水混液 200 ml で溶出した。溶出液中のメタノールを留去し、その残留液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを 3 倍容加え、生成した沈殿を遠心分離により集めた。沈殿をエタノールで再洗浄して濾取、真空乾燥することで、求めるコンドロイチン硫酸 C - リン脂質結合体 (CSC - PE) が 0.8 g 得られた。

【0031】

(参考例 2)

コンドロイチン硫酸 A - ホスファチジルエタノールアミン結合体 (CSA - PE) の合成
クジラ軟骨由来コンドロイチン硫酸 A (CSA, 生化学工業 (株) 製、平均分子量 15,000) 1.0 g を参考例 1 と同様にして、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、疎水クロマトグラフィーで精製して、目的のコンドロイチン硫酸 A - 脂質結合体 (CSA - PE) が 0.31 g 得られた。

【0032】

(参考例 3)

コンドロイチン硫酸 D - ホスファチジルエタノールアミン結合体 (CSD - PE) の合成
サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸 D (CSD, 生化学工業 (株) 製、平均分子量 20,000) 1.18 g を参考例 1 と同様にして、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、疎水クロマトグラフィーで精製して、目的のコンドロイチン硫酸 D - 脂質結合体 (CSD - PE) が 0.35 g 得られた。

【0033】

(参考例 4)

コンドロイチン硫酸 E - ホスファチジルエタノールアミン結合体 (CSE - PE) の合成
イカ軟骨由来コンドロイチン硫酸 E (CSE, 生化学工業 (株) 製、平均分子量 100,000) 1.7 g を参考例 1 と同様にして、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、疎水クロマトグラフィーで精製して、目的のコンドロイチン硫酸 E - 脂質結合体 (CSE - PE) が 0.66 g 得られた。

【0034】

(参考例5)

デルマトン硫酸 - ホスファチジルエタノールアミン結合体 (DS - PE) の合成
ニワトリ鶏冠由来デルマトン硫酸 (DS, 生化学工業 (株) 製、平均分子量 32,000) 0.8 g を参考例 1 と同様に、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、疎水クロマトグラフィーで精製して、目的のデルマトン硫酸 - 脂質結合体 (DS - PE) が 0.23 g 得られた。

【0035】

(参考例6)

ヒアルロン酸 - ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン結合体 (HA - PE) の合成

羊睾丸由来ヒアルロニダーゼ (シグマ社) により限定分解して得た低分子化鶏冠由来ヒアルロン酸 (HA、生化学工業 (株) 製、平均分子量 23,000) 0.9 g を参考例 1 と同様に、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、ヒアルロン酸 - 脂質結合体 (HA - PE) が 0.3 g 得られた。

【0036】

(参考例7)

ヘパリン - ホスファチジルエタノールアミン結合体 (HP - PE) の合成

ウシ腸管由来ヘパリン (Hep、和光純薬社製、平均分子量 10,000) 6.0 g を参考例 1 と同様に、塩交換をし、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと反応させて、ヘパリン - 脂質結合体 (HP - PE) が 0.45 g 得られた。

【0037】

(実施例1)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸 C 誘導体 (CSC - PE) の合成

参考例 1 で得られた CSC-PE 5.25 mg を 0.5 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.2) に溶解し、光反応性化合物である架橋試薬 Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionate (Sulfo-SBED, Pierce社製) 1.1 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加、混合し、遮光状態で室温 3 時間静置反応した。以後の操作は全て遮光下で実験を行った。

【0038】

反応後、0.1 mmol/ml のエタノールアミン水溶液 10 μ l を添加して更に室温で 10 分間反応させて、Sulfo-SBED の未反応の活性エステル基を潰した。反応液に 1.3% 酢酸カリウム含有 95% エタノールを加え、-20 で 1 時間静置後、13,000 rpm で 20 分間遠心分離して沈殿を集め、再度 PBS 0.5 ml を加えて溶解させ、その遠心 (13,000 rpm, 10 分間) 上清を脱塩カラム (First Desalting Column, Pharmacia社製) にアプライし、PBS を緩衝液として 2 ml/min の流速で流し、ボイド画分 (1.1 ~ 1.8 分の溶出液) 1.4 ml を集めた。

【0039】

得られた光反応性 CSC-PE 溶液は、0.2 μ l ずつに分注し、遮光下 -80 で保存した。この標品のコンドロイチン硫酸含量はカルバゾール法で、2.0 mg/ml あり、コンドロイチナーゼ ABC 消化され、その消化液の二糖分析値は元のコンドロイチン硫酸原料の二糖分析値と良く一致した。

【0040】

(実施例2)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸 A 誘導体 (CSA - PE) の合成

参考例 2 で得られた CSA-PE 5.22 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.35 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 CSA-PE 溶液 (2.13 mg/ml) を得た。

【0041】

(実施例3)

10

20

30

40

50

反応性ホスファチジルエタノールアミン結合デルマタン硫酸誘導体 (DS-PE) の合成
参考例 5 で得られた DS-PE 5.68 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.08 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 DS-PE 溶液 (1.76 mg/ml) を得た。

【0042】

(実施例 4)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸 D 誘導体 (CSD-PE) の合成

参考例 3 で得られた CSD-PE 5.50 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.18 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 CSD-PE 溶液 (2.28 mg/ml) を得た。

10

【0043】

(実施例 5)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸 E 誘導体 (CSE-PE) の合成

参考例 4 で得られた CSE-PE 5.88 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.40 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 CSE-PE 溶液 (1.52 mg/ml) を得た。

【0044】

(実施例 6)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合ヒアルロン酸誘導体 (HA-PE) の合成
参考例 6 で得られた HA-PE 5.73 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.19 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 HA-PE 溶液 (1.58 mg/ml) を得た。

20

【0045】

(実施例 7)

光反応性ホスファチジルエタノールアミン結合ヘパリン誘導体 (HP-PE) の合成

参考例 7 で得られた HP-PE 6.77 mg を 0.5 ml の PBS (pH 7.2) に溶解し、Sulfo-SBED 1.39 mg の DMSO (20 μ l) 溶液を添加し、実施例 1 と同様に架橋反応し、エタノール沈殿、脱塩精製により、光反応性 HP-PE 溶液 (2.66 mg/ml) を得た。

30

【0046】

(実施例 8)

細胞表面蛋白質と光反応性 CSC-PE との結合試験

48穴のプラスチックプレートに上記実施例 1 の光反応性 CSC-PE を 5, 10, 20, 50 μ g/ml と濃度を変えて 200 μ l/well 添加して、4 で一晩静置して塗布させた。ハンクス液で 2 回洗浄した後、マウス由来培養繊維芽細胞株 10T1/2 の 1×10^5 cell/ml 懸濁液を 200 μ l/well 添加し、5%CO₂ 環境下 37 で 5 分および 15 分間インキュベートし、直ちに 340nm の紫外線を 1 分間照射した。非接着細胞をピペティングで除き、接着細胞が残ったプレートに SDS-page 用 sample buffer とジチオスレイトール (DTT) を加え懸濁し、100 3 分間の加熱処理後、その半分を 10% SDS-page にかけた。電気泳動後、ウェスタンブロッティングを行い、パーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを反応させ、ECL 法 (Amersham 社製) で、ビオチンを含む架橋試薬が結合した蛋白質群を検出した。図 1 にそのパターンを示す。分子量 120k, 80k, 70k, 50k, 40-30k 付近にいくつかのはっきりした蛋白質バンドが見られた。

40

【0047】

これらは、コンドロイチン硫酸に結合した蛋白質あるいはコンドロイチン硫酸の近傍にあった蛋白質と考えられ、接着した際にコンドロイチン硫酸と特異的に相互作用する細胞表面蛋白質が複数存在することが伺われる。なお、このとき DTT 処理をしているためジスルフィド結合が切り離され、コンドロイチン硫酸部分は分離されて泳動される。

【0048】

同様に、実施例 2 から 7 で得た各種光反応性 GAG-PE 誘導体をプレートの固相化し、結合す

50

る細胞表面蛋白質群の分析を行い、上記CSC結合蛋白質とは一部異なったパターンの蛋白質バンドが見られた。これらから、それぞれのGAG糖鎖に特異的なあるいは共通な細胞表面結合蛋白質を解析することが出来る。

【 0 0 4 9 】

【発明の効果】

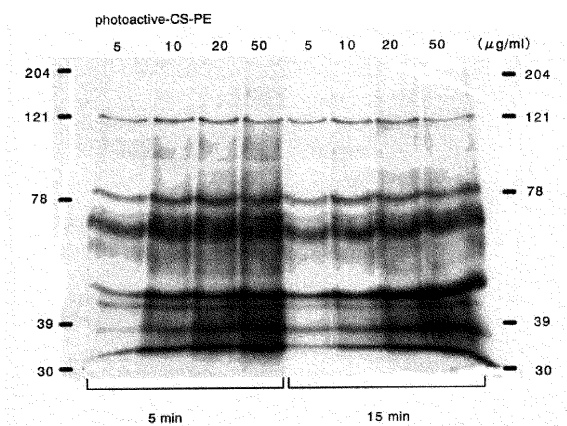
本発明の光反応性糖化合物および標識化光反応性糖化合物は、固層に固定化することにより、糖と相互作用する蛋白質（糖受容体）を簡単に捕捉することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 光反応性CSC-PEと細胞表面蛋白質との光反応架橋物のウエスタンブロッティングを示す図である。

10

【図 1】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平 0 6 - 0 7 3 1 0 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C08B 1/00-37/18

G01N 33/532

G01N 33/566

CA/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)