(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 7 月 20 日(20.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/122613 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 14/42 (2006.01) *G01N 33/531* (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/000418

(22) 国際出願日: 2017 年 1 月 10 日(10.01.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-005274 2016 年 1 月 14 日(14.01.2016) JP

(71) 出願人: 株式会社Ｊ－オイルミルズ (J-OIL MILLS, INC.) [JP/JP]; 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 岡本　裕樹(OKAMOTO Yuki); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号　株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP). 小林　夕香(KOBAYASHI Yuka); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP). 上野　泰(UENO Yasushi); 〒1040044 東京都中央区明石町８番１号　株式会社Ｊ－オイルミルズ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 中嶋　伸介(NAKAJIMA Shinsuke); 〒1010032 東京都千代田区岩本町２丁目１０－５－６０５中嶋弁理士事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:
— 発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv))

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正を受理した際には再公開される。（規則 48.2(h)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: METHOD FOR ENHANCING AFFINITY OF SYNTHETIC *PHOLIOTA SQUARROSA* LECTIN

(54) 発明の名称 : 合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a method for enhancing the affinity to α(1→6)-linked-fucose sugar chains of synthetic *Pholiota squarrosa* lectin obtained by chemical synthesis or synthesis through genetic engineering, and a use for said method. [Solution] This method includes a step in which the synthetic *Pholiota squarrosa* lectin is immersed in a solution that includes at least one surfactant selected from the group consisting of a polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, polyoxyethylene (9) octylphenyl ether, and octyl glucoside. The present invention further provides a measurement method for α(1→6)-linked-fucose sugar chains that involves reacting α(1→6)-linked-fucose sugar chains and the aforementioned synthetic *Pholiota squarrosa* lectin having enhanced affinity, and detecting the lectin reacting thereto.

(57) 要約: 【課題】化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンとフコースα１→６糖鎖との親和性を向上させる方法、及びその用途を提供する。 【解決手段】本発明の方法は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に前記合成スギタケレクチンを浸漬するステップを含む。本発明は、さらに、上記親和性の向上した合成スギタケレクチンとフコースα１→６糖鎖とを反応させ、反応したレクチンを検出することを含む、フコースα１→６糖鎖の測定方法を提供する。

WO 2017/122613 A1

明　細　書

発明の名称 ： 合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法

技術分野

[0001] 本発明は、合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法に関し、より詳細には、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンのフコースα１→６糖鎖への親和性を向上させる方法に関する。

背景技術

[0002] フコースα１→６糖鎖と親和性を有するレクチンとして、従来、レンズマメレクチン（ＬＣＡ）、エンドウマメレクチン（ＰＳＡ）、ヒイロチャワンタケレクチン（ＡＡＬ）、ラッパスイセンレクチン（ＮＰＡ）、ソラマメレクチン（ＶＦＡ）、麹菌レクチン（ＡＯＬ）等が知られている。これらのレクチンは、α１→６結合以外のフコースを持つ糖脂質系糖鎖や、フコースを持たないハイマンノース糖鎖にも親和性を示す。

[0003] 本発明者等は、担子菌の一種であるスギタケから抽出精製したスギタケレクチン（以下、ＰｈｏＳＬという）が、従来のレクチンよりも特異的にフコースα１→６糖鎖を認識するという特性を有することを発見した（非特許文献１）。ＰｈｏＳＬは、４０個のアミノ酸からなり、耐熱性や耐ｐＨ性にも優れるという性質を持つ。ＰｈｏＳＬは、フコースα１→６糖鎖が関与する疾患の診断薬、フコースα１→６糖鎖の検出方法、フコースα１→６糖鎖の分別方法等への利用が大いに期待される。

[0004] ＰｈｏＳＬの構成アミノ酸数は、４０個と少ないため、化学合成や遺伝子工学的合成が比較的容易である（特許文献１及び２）。合成されたＰｈｏＳＬは、安定供給、生産コスト低減、純度の向上、活性の改善等に有益であると考えられる。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第５４８０６４４（ペプチド）

特許文献2：特許第５５３１２９０（遺伝子）

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｙｕｋａ　Ｋｏｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，”Ａ　Ｎｏｖｅｌ　Ｃｏｒｅ　Ｆｕｃｏｓｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｌｅｃｔｉｎ　ｆｒｏｍ　ｔｈｅ　Ｍｕｓｈｒｏｏｍ　Ｐｈｏｌｉｏｔａ　ｓｑｕａｒｒｏｓａ”，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ，２０１２，２８７，ｐ３３９７３－３３９８２

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 一般に、化学合成や遺伝子工学的合成により作製されたタンパク質は、アミノ酸修飾や化学修飾が均一であるため、品質が均一のものが得られやすいといわれている。合成ＰｈｏＳＬの場合、糖タンパク質への親和性を有するものの、そのレベルが天然物由来のＰｈｏＳＬよりも劣ることが、これまでの知見でわかっている。

[0008] そこで、本発明の課題は、化学合成や遺伝子工学的合成により得られる合成ＰｈｏＳＬのフコースα１→６糖鎖への親和性を向上させるための方法、及びその用途を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等は、上記課題を鋭意検討した結果、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンを特定の界面活性剤溶液で前処理することにより、フコースα１→６糖鎖への親和性が未処理の合成ＰｈｏＳＬよりも改善されることを発見し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンのフコースα１→６糖鎖との親和性を向上させる方法であって、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に前記合成スギタケレクチンを浸漬するステップを含む、前記合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法を提供する

。以下、「化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチン」を、本明細書において、「合成ＰｈｏＳＬ」と略することがある。

[0010] 前記溶液の界面活性剤濃度は、０．０１～６重量％であることが好ましい。

[0011] 前記浸漬の時間は、５分～４８時間であることが好ましい。

[0012] 前記合成ＰｈｏＳＬは、例えば配列番号１に示すアミノ酸配列、又は配列番号１中の１又は数個のアミノ酸が置換、付加又は欠失され、かつ糖結合活性を有するアミノ酸改変ペプチドである。

[0013] 合成ＰｈｏＳＬのアミノ酸改変ペプチドは、例えば配列番号３～１７のいずれかで示される。

[0014] 本発明は、また、上記合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法の用途を提供する。すなわち、本発明は、フコースα１→６糖鎖の測定方法であって、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンを浸漬して、前記フコースα１→６糖鎖との親和性が向上した前記合成スギタケレクチンを得るステップ、及び、

前記親和性が向上した合成スギタケレクチンと前記フコースα１→６糖鎖とを反応させ、反応したレクチンを検出するステップ

を含む、前記測定方法を提供する。

[0015] 前記フコースα１→６糖鎖は、担体に固定化されていることが好ましい。

[0016] 前記フコースα１→６糖鎖は、抗体を介して前記担体に固定化されていてもよい。

[0017] 前記合成スギタケレクチンは、標識されていることが好ましい。

発明の効果

[0018] 本発明の合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法によれば、合成ＰｈｏＳＬのフコースα１→６糖鎖に対する親和性が改善される。改善の理

由は、発明を限定するものではないが、特定の界面活性剤溶液中での合成ＰｈｏＳＬの養生が、その立体構造を天然由来のＰｈｏＳＬのものに近づけるためと考えられる。

[0019] 親和性の改善した上記合成ＰｈｏＳＬを、フコースα１→６糖鎖との反応試験に用いることを特徴とする本発明のフコースα１→６糖鎖の測定方法によれば、フコースα１→６糖鎖の測定感度が向上する。したがって、本発明によって、フコースα１→６糖鎖の特異的結合剤、フコースα１→６糖鎖研究用試薬、フコースα１→６糖鎖と関係する腫瘍マーカーの検出、フコースα１→６糖鎖と関連する疾患の予後や治療効果の判定、並びに、フコースα１→６糖鎖と関連する新規腫瘍マーカーの探索等への合成ＰｈｏＳＬの利用が促進される。

発明の実施の形態

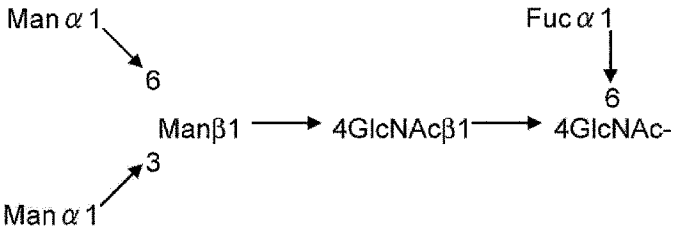
[0020] 以下に、本発明の実施態様を詳細に説明する。本発明の合成ＰｈｏＳＬとフコースα１→６糖鎖との親和性を向上させる方法は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に前記合成ＰｈｏＳＬを浸漬するステップを含むことを必須とする。各構成要件を、以下に、詳細に説明する。

[0021] 上記フコースα１→６糖鎖とは、Ｎ型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１→６結合でフコースが結合した構造を意味し、Ｎ結合型糖鎖である限り、遊離のオリゴ糖鎖、糖ペプチド、糖タンパク質、細胞等のすべてを包含する。また、標識のようにオリゴ糖鎖等を化学修飾したものも含まれる。上記Ｎ結合型の糖鎖は、高マンノース型、複合型、混成型等であり得る。さらに、前記糖鎖は、酸、ヒドラジン等で化学的に前記糖鎖を部分的に分解したもの、シアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ、α１→２フコース・α１→３フコース・α１→４フコースを切断するフコシダーゼ、マンノシダーゼのいずれかの酵素を同時にあるいは段階的に使用して前記糖鎖を部分的に分解したものであってもよい。また、グル

コースのような糖、アセチル基、硫酸基、リン酸基のような官能基等を前記糖鎖に付加したものであってもよい。

[0022] フコースα１→６糖鎖の代表例を、以下に示す。

[化1]



〔式中、Ｍａｎはマンノース、ＧｌｃＮＡｃはＮ－アセチルグルコサミン、Ｆｕｃはフコースを意味する〕

[0023] フコースα１→６糖鎖の特に好ましい具体例は、ＡＦＰ－Ｌ３、フコシル化ハプトグロビン等の腫瘍マーカーである。

[0024] 本発明の対象となる合成ＰｈｏＳＬのアミノ酸配列は、スギタケから抽出精製される天然由来のＰｈｏＳＬ（以下、天然ＰｈｏＳＬという）をベースとする。天然ＰｈｏＳＬのアミノ酸配列を、配列番号１に示す。 配列番号１の第１０及び１７番目のＸａａは、任意のアミノ酸残基であってよいが、好ましくはＣｙｓである。第２０、２３、２７、３３、３５及び３９番目のＸａａは、それぞれ、Ｔｙｒ／Ｓｅｒ、Ｐｈｅ／Ｔｙｒ、Ａｒｇ／Ｌｙｓ／Ａｓｎ、Ａｓｐ／Ｇｌｙ／Ｓｅｒ、Ａｓｎ／Ａｌａ、及び、Ｔｈｒ／Ｇｌｎである。

[0025] 天然ＰｈｏＳＬは、フコースα１→６糖鎖に対して親和性を有する従来のレクチン（例えばＡＡＬ）と比べてより特異的にフコースα１→６糖鎖と結合する。

[0026] 天然ＰｈｏＳＬの糖認識活性は、具体的には、

（１）フコースα１→６糖鎖に対して結合定数（２５℃において）が、通常、５．０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$以上、より好ましくは１．０×１０^{5}Ｍ$^{-1}$以上、さらに

好ましくは２．０×１０^{5}M^{-1}以上で示される親和性を有する、

（２）α１→６フコースを含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１→６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対して実質的に結合しない、

で表される。

[0027] （２）の「実質的に結合しない」という特徴は、より具体的には、α１→６フコースを含まないハイマンノース糖鎖及び／又はα１→６フコースを含まない糖脂質糖鎖に対する結合定数（２５℃において）が、通常、１．０×１０^{3}M^{-1}以下であり、好ましくは１．０×１０^{2}M^{-1}以下、特に好ましくは０であることを意味する。

[0028] ＰｈｏＳＬは、さらに、α１→６フコースの結合したＮ結合型の一本鎖、二本鎖、三本鎖及び／又は四本鎖の糖鎖に対する結合定数（２５℃において）が、好ましくは、１．０×１０^{4}M^{-1}以上、より好ましくは、５．０×１０^{4}M^{-1}以上、さらに好ましくは１．０×１０^{5}M^{-1}以上で示される親和性を有する。

[0029] 前記結合定数は、本明細書において、例えばフロンタルアフィニティクロマトグラフィー（ＦＡＣ法）を用い、分析温度２５℃において測定される数値を意味する。

[0030] 上記天然ＰｈｏＳＬのアミノ酸配列をベースに、本発明の方法に使用する合成ＰｈｏＳＬが作製される。合成ＰｈｏＳＬ取得のために、配列番号１のＸａａを特定した一例を、配列番号２に示す。

[0031] 天然ＰｈｏＳＬと同じアミノ酸配列を有する合成ＰｈｏＳＬは、天然ＰｈｏＳＬのように、フコースα１→６糖鎖に対して親和性を有する（特許文献１及び２）。本発明で合成ＰｈｏＳＬを前処理することによって、合成ＰｈｏＳＬのフコースα１→６糖鎖に対する親和性を天然ＰｈｏＳＬと同等又はそれ以上に向上させることができる。

[0032] 合成ＰｈｏＳＬは、配列番号１中の１又は数個のアミノ酸が置換、付加又は欠失され、かつフコースα１→６糖鎖に対する糖結合活性を有するアミノ酸改変ペプチドであってもよい。

[0033] 前記アミノ酸改変ペプチドの等電点は、天然ＰｈｏＳＬの等電点（４．６７）と同等、もしくはそれよりも高いことが、利用上好ましく、さらに４．６９～９．００の範囲にある。

[0034] 前記アミノ酸改変ペプチドの具体例は、配列番号１のＸａａを特定した配列番号２の配列において、１個又は複数のアミノ酸がグルタミン酸等で置換され、かつ糖結合活性を有するペプチドである。グルタミン酸での置換は、等電点の変化が小さく、側鎖の炭素数を増加させることにより、立体構造を若干変化させると考えられる。そのような例として、配列番号３が挙げられる。

[0035] 前記アミノ酸改変ペプチドの別の具体例は、配列番号１のＸａａを特定した配列番号２の配列において、１個又は複数のアミノ酸がリジンで置換され、かつ糖結合活性を有するペプチドである。塩基性アミノ酸であるリジンでの置換は、糖結合活性を強化し、また、糖結合活性を維持しつつ、ペプチドの等電点を増大させる。そのような例として、配列番号４、５、６、７及び１２が挙げられる。等電点の増大は、親和電気泳動分析の分解能の向上に寄与する。

[0036] 前記アミノ酸改変ペプチドの別の具体例は、配列番号１のＸａａを特定した配列番号２の配列において、１個又は複数のアミノ酸がアルギニンで置換され、かつ糖結合活性を有するペプチドである。塩基性アミノ酸であるアルギニンの置換は、糖結合活性を維持しつつ、ペプチドの等電点を増大させる。そのような例として、配列番号１４が挙げられる。

[0037] 上記リジン又はアルギニンで置換されるアミノ酸は、糖結合活性の強さを変更する点で、アラニン、プロリン、バリン、トレオニン及びグリシンからなる群から選ばれる少なくとも一種であることが好ましい。

[0038] リジンで置換される場合、特にアミノ酸配列のＮ末端側のアラニン（配列番号４～７）、プロリン（配列番号５～７）、バリン（配列番号６～７）、あるいはアミノ酸配列のＣ末端側のトレオニン及びグリシンが２個のリジン（配列番号１２）で置換されることが好ましい。

[0039] アルギニンで置換される場合、特にアミノ酸配列のＣ末端側のトレオニン及びグリシンが２個のアルギニンで置換されることが好ましい。そのような例として、配列番号１４が挙げられる。

[0040] アミノ酸改変ペプチドの置換されるアミノ酸の個数は、１個又は数個であり、好ましくは１～４個である。

[0041] 上記リジン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列に、さらに、１又は数個のリジン及び／又はアルギニンを付加してもよい。そのような例として、配列番号１１が挙げられる。

[0042] 前記アミノ酸改変ペプチドのさらに別の具体例は、配列番号１のＸａａを特定した配列番号２の配列において、リジン及び／又はアルギニンが付加され、かつ糖結合活性を有するペプチドである。このとき付加されるアミノ酸の個数は、１個又は数個であり、好ましくは１～２個である。具体例として、配列番号１６が挙げられる。

[0043] 上記リジン及び／又はアルギニンで置換及び／又は付加された場合、さらにリジン又はアルギニン以外のアミノ酸が欠失することは、糖結合活性を有する限り可能である。そのような例として、配列番号８～１０、１３及び１５が挙げられる。

[0044] リジンで置換又は付加される場合、欠失してもよいアミノ酸としては、トレオニン及びグリシンの少なくとも一種が好ましい。トレオニン欠失の例として、配列番号８～１３及び１５、そして、グリシン欠失の例として、配列番号８～１３及び１５が挙げられる。

[0045] アミノ酸の欠失を伴う場合、リジンで置換してもよいアミノ酸は、トレオニン（配列番号８、９及び１３）、アラニン（配列番号９）、チロシン（配列番号９及び１０）、及びヒスチジン（配列番号１５）からなる群から選ばれる少なくとも一種であることが好ましい。

[0046] 欠失されるアミノ酸の個数は、１個又は数個であり、好ましくは１～２個である。

[0047] 配列番号１のアミノ酸配列に対して置換、欠失及び付加の少なくとも一種

で変更されるアミノ酸の数は、１～数個であり、好ましくは１～４個である。

[0048]

[表1]

配列番号	アミノ酸配列	注釈
1	APVPVTKLVX DGDTYKXTAX LDXGDGXWVA QWXTXVFHXG	—
2	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号１のXを特定
3	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LEFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号２のD→E置換
4	KPVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号２のA→K置換
5	KKVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号２のAP→KK置換
6	KKKPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号２のAPV→KKK置換
7	KKKKVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTG	配列番号２のAPVP→KKKK置換
8	KAPVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHK	配列番号２に K付加、T→K置換、G欠失
9	KPVPVTKLVC DGDTYKCTAK LDFGDGRWVA QWDTNVFHK	配列番号２のA,Y,T→K,K,K、G欠失
10	APVPVTKLVC DGDTYKCTAK LDFGDGRWVA QWDTNVFH_	配列番号２のY→K置換、TG欠失
11	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHKKK	配列番号２のTG→KK置換、K付加
12	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHKK	配列番号２のTG→KK置換
13	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHK_	配列番号２のT→K置換、G欠失
14	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHRR	配列番号２のTG→RR置換
15	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFK__	配列番号２のH→K置換、TG欠失
16	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDFGDGRWVA QWDTNVFHTGK-Biotin	配列番号２にK-Biotin付加
17	APVPVTKLVC DGDTYKCTAY LDYGDGKWVA QWDTAVFHTT	配列番号２のF→Y、R→K、N→A、G→T置換

[0049] 上記合成レクチンを取得するための化学合成又は遺伝子工学的手法は、特に制限されず、汎用の方法を使用可能である。例えば、化学合成には、ペプチド固相合成法や液相合成法が知られている。さらに具体的には、Ｆｍｏｃ（Ｆｌｕｏｒｅｎｙｌ－Ｍｅｔｈｏｘｙ－Ｃａｒｂｏｎｙｌ）法、Ｂｏｃ（ｔｅｒｔ－Ｂｕｔｙｌ Ｏｘｙ Ｃａｒｂｏｎｙ）法、Ｃｂｚ（Ｂｅｎｚｙｌｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ Ｃｈｌｏｒｉｄｅ）法等の有機合成化学的手法が挙げられる。

[0050] 遺伝子工学的合成とは、天然由来のＰｈｏＳＬのアミノ酸配列をコードする核酸を用いて天然由来とは異なる公知の宿主内で人工的に発現させたリコンビナントを得ることを意味する。合成ＰｈｏＳＬの遺伝子工学的製造方法については、特許文献２に詳細に記載されている。特許文献２を参照のために本明細書に編入する（文献中のツチスギタケをスギタケに、そしてＰＴＬをＰｈｏＳＬに読み替える）。

[0051] 前記合成ＰｈｏＳＬは、同一又は異なるペプチドがサブユニットとなって複数会合し、かつ糖結合活性を有するペプチドでもよい。会合により、糖結合活性や赤血球凝集活性が向上する場合がある。ペプチドの会合数は、通常、２個以上であり、好ましくは２～１０個、特に好ましくは２～４個である。

[0052] 複数のペプチドを会合させる方法は、糖結合活性を消失させない限り、特に制限されない。例えば、アビジン－ビオチン反応、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩等の縮合剤による反応が挙げられる。また、ＰｈｏＳＬの全長ｃＤＮＡは、３種類の糖認識ドメイン（Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ Ｄｏｍａｉｎ）ＣＲＤ１、ＣＲＤ２及びＣＲＤ３を有する。これらのドメインは、天然ＰｈｏＳＬと８０％以上の相同性を有する。遺伝子工学的合成時に、これらの糖認識ドメインの少なくとも２種が発現するように合成を行ってもよい。

[0053] 前記合成ＰｈｏＳＬは、検出可能にする標識手段が組み込まれていることが好ましい。標識手段は、特に制限なく公知の標識化方法を適用できる。例

えば、放射性同位元素による標識化、標識化合物の結合等を挙げることができる。また、前記合成ＰｈｏＳＬは抗ＰｈｏＳＬ抗体を介して検出してもよい。

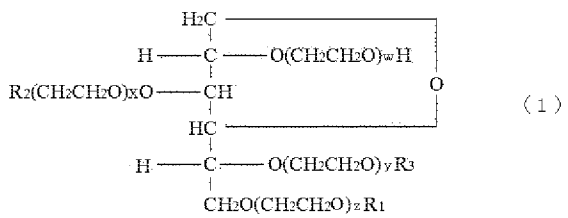
[0054] 前記標識化合物としては、例えば酵素標識（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）、ビオチン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識（フロオレッセインイソチアシアナート、ＣｙＤｙｅ（登録商標）、４－アミノ安息香酸エチル（ＡＢＥＥ）、アミノピリジン、アロフィコシアニン、フィコエリスリン等）等を挙げることができる。これらの標識化合物は、常法により、ＰｈｏＳＬと結合することができる。特に、ビオチン標識は、感度が高く、合成に適している点で好ましく、例えば、リジンにビオチンが結合した配列番号１６が挙げられる。また、検出や精製等を目的として、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ、ＧＳＴタグ等を付加してもよい。そのような例として配列番号１８が挙げられる。

[0055] 合成ＰｈｏＳＬの糖結合特異性の測定は、常法により行うことができる。例えば、合成ＰｈｏＳＬを添加した溶液をキャピラリー電気泳動装置に充填し、標識した標準糖鎖を展開させる。泳動後、標識に基づいた検出手段で検出する。

[0056] 本発明の方法に使用する界面活性剤溶液は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤の溶液である。

[0057] ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルは、下記式（１）：

[化2]



（１）

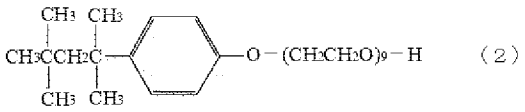
〔式中、R_1～R_3は、それぞれ、炭素数１１～１７のアルキル基又はアルケニル基であり、ｘ、ｙ、ｚ及びｗは整数であり、ｘ、ｙ、ｚ及びｗの合計は、通常、１～５０であり、好ましくは１５～２５であり、特に好ましくは２０である。〕

によって表される。

[0058] ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルは、ソルビトール及び無水ソルビトールの水酸基の一部を脂肪酸でエステル化することにより得られるソルビタン脂肪酸エステルに、酸化エチレンを縮合させることにより得られる。ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルは、市販のものを使用可能である。その例は、Ｔｗｅｅｎ　２０、４０、６０、８０、６５及び８５である。Ｔｗｅｅｎ２０（モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1が主としてラウリン酸（$CH_3(CH_2)_{10}CO-$）であり、そしてR_2及びR_3がＨである。Ｔｗｅｅｎ４０（モノパルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1が主としてパルミチン酸（$CH_3(CH_2)_{14}CO-$）であり、そしてR_2及びR_3がＨである。Ｔｗｅｅｎ６０（モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1が主としてステアリン酸（$CH_3(CH_2)_{16}CO-$）であり、そしてR_2及びR_3がＨである。Ｔｗｅｅｎ８０（モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1が主としてオレイン酸（$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CO-$）であり、そして$R_2$及び$R_3$がＨである。Ｔｗｅｅｎ６５（トリステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1、R_2及びR_3が、主としてステアリン酸である。Ｔｗｅｅｎ８５（トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）は、式１のR_1、R_2及びR_3が、主としてオレイン酸である。好ましくは、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルの脂肪酸がラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸又はオレイン酸であり、特に好ましくはラウリン酸である。

[0059] ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテルは、下記式（２）：

[化3]



（２）

により表される。

[0060] ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテルは、市販のものでもよい。その例は、ＮＰ－４０ （Ｎｏｎｉｄｅｔ Ｐ－４０、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂ製）が挙げられる。

[0061] 上記界面活性剤溶液の溶媒には、水、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液等が挙げられる。好ましくは水又はＰＢＳであり、特に好ましくは水である。

[0062] 上記溶液の界面活性剤濃度は、通常、０．０１～６重量％でよく、好ましくは、０．０１～５重量％であり、より好ましくは０．０５～５重量％であり、特に好ましくは０．０７～３重量％である。

[0063] 上記界面活性剤溶液に合成ＰｈｏＳＬを浸漬させる温度は、通常、２～５０℃でよく、好ましくは４～４０℃であり、より好ましくは４～３５℃である。

[0064] 前記浸漬の時間は、浸漬温度によるが、通常、５分～４８時間でよく、好ましくは１０分～２４時間、特に好ましくは２０分～２４時間である。

[0065] フコースα１→６糖鎖の測定方法であって、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンを浸漬して、前記フコースα１→６糖鎖との親和性が向上した前記合成スギタケレクチンを得るステップ、及び前記親和性が向上した合成スギタケレクチンと前記フコースα１→６糖鎖とを反応させ、反応したレクチンを検出するステップを含む、前記測定方法を説明する。

[0066] 前記フコースα１→６糖鎖との親和性が向上した前記合成ＰｈｏＳＬを得るステップは、上記の合成ＰｈｏＳＬの親和性を向上させる方法で説明したとおりである。親和性が向上した前記ＰｈｏＳＬと前記フコースα１→６糖鎖とを反応させ、反応したレクチンを検出するステップを以下に説明する。

[0067] 該反応レクチンを検出する手段は、特に制限されない。具体的には、上記検出手段として、例えば、ＥＬＩＳＡ（直接吸着法、サンドウィッチ法、及び競合法）、レクチンアフィニティクロマトグラフィー、レクチン染色、レクチンチップ、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）法、凝集法、表面プラズモン共鳴法（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）システム）、電気泳動、ビーズ等が使用可能である。いくつかの代表的な検出方法を概説する。

[0068] 直接吸着ＥＬＩＳＡ法では、血液等の検体をプレートに添加して固定化する。次いで、ビオチン標識したレクチンを添加して、糖鎖とレクチンとを反応させる。２次標識化合物としてＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識ストレプトアビジン溶液を添加して、ビオチンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、ＨＲＰ用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光光度計で測定する。予め、既知の濃度の糖鎖を含む標準試料によって検量線を作成しておけば、糖鎖の定量化も可能である。また、ビオチン標識したレクチンに代えて、標識していないレクチンを使用し、糖鎖とレクチンとの反応後、抗レクチン抗体を使用することで測定をすることもできる。

[0069] サンドイッチＥＬＩＳＡ法では、フコースα１→６糖鎖を有する抗原に結合する抗体をプレートに添加し固定化してから、血清等の検体を添加する。次いで、ビオチン標識したレクチンを添加して、糖鎖とレクチンとを反応させる。２次標識化合物としてＨＲＰ標識ストレプトアビジン溶液を添加して、ビオチンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、ＨＲＰ用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光光度計で測定する。予め、既知の濃度の標準試料によって検量線を作成しておけば、フコースα１→６糖鎖の定量化も可能である。

[0070] レクチンアフィニティクロマトグラフィーは、担体に固定化されたレクチ

ンが糖鎖と特異的に結合する性質を利用したアフィニティクロマトグラフィーである。ＨＰＬＣと組み合わせることでハイスループットが期待される。

[0071] レクチンの固定化担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース、スターチ、ポリアクリルアミド等のゲル材が一般的である。これらには、市販のものを特に制限なく使用でき、例えばセファロース４Ｂやセファロース６Ｂ（共にＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）が挙げられる。レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、マイクロプレートやナノウエルにレクチンを固定化したものも含まれる。

[0072] 固定化するレクチンの濃度は、通常、０．００１～１００ｍｇ／ｍＬ、好ましくは０．０１～２０ｍｇ／ｍＬである。担体がアガロースゲルの場合、それをＣＮＢｒ等で活性化してからレクチンとカップリングさせる。活性化スペーサーを導入したゲルにレクチンを固定化してもよい。さらには、ホルミル基を導入したゲルにレクチンを固定化してから$NaCNBH_3$で還元してもよい。また、ＮＨＳ－セファロース（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）のような市販の活性化ゲルを使用してもよい。

[0073] 検体をカラムに供与した後、洗浄の目的で緩衝液を流す。緩衝液の一例は、モル濃度が、通常、５～５００ｍＭ、好ましくは１０～５００ｍＭであり、ｐＨが、通常、４．０～１０．０、好ましくは６．０～９．０であり、ＮａＣｌ含量が、通常、０～０．５Ｍ、好ましくは０．１～０．２Ｍであり、$CaCl_2$、$MgCl_2$、又は、$MnCl_2$含量が、通常、０～１０ｍＭ、好ましくは０～５ｍＭの緩衝液である。

[0074] アフィニティカラムの洗浄後、糖鎖の溶出は、糖鎖を有効に溶出できる中性の非変性緩衝液中で、塩化ナトリウム、ハプテン糖等の脱着剤を用いて行われる。この緩衝液は、上記と同様であってもよい。脱着剤の濃度は、好ましくは、１～５００ｍＭ、特に好ましくは１０～２００ｍＭである。

[0075] レクチン染色では、腫瘍組織等の検体を薄く切り出し、その薄片をガラスプレートに貼り付ける。ブロッキングバッファーにプレートを浸し、室温で緩く攪拌する。適宜、内因性ペルオキシダーゼ不活性化を行う。ビオチン標

識レクチン溶液（２～５μｇ／ｍｌにブロッキングバッファーで希釈）にプレートを浸し、室温で１時間、緩く撹拌する。洗浄後、ＨＲＰ標識アビジン溶液にプレートを浸し、室温で緩く攪拌する。発色液にプレートを浸し、室温で数分間発色させる。発色が十分確認できたら水で洗浄し、反応を停止させる。発色した組織を光学顕微鏡で観察する。レクチン染色には、市販のレクチン染色キットを用いることができる。

[0076] ＦＡＣＳ法では、細胞（検体）をリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）に懸濁する。２１Ｇの針をつけた２．５ｍｌサイズのシリンジで、１０回程度強く出し入れして細胞をほぐした後、５０μｍのメッシュで細胞を濾過する。このように調製した細胞に、蛍光標識したレクチンの溶液を加えて、細胞とレクチンとを結合させる。その後、フローサイトメーター（例えば、ベックマンコールター社製Ｃｙｔｏｍｉｃｓ　ＦＣ　５００）で、レクチンの結合した細胞の量や割合を分析する。

[0077] 上記の検出手段に用いる検体は、特に限定されない。例えば、血液、血漿、血清、涙、唾液、体液、乳汁、尿、細胞の培養上清、形質転換動物からの分泌物等が挙げられる。

[0078] 本発明の測定方法の具体的な用途は、フコースα１→６糖鎖の検出を目的とするものである限り、特に限定されない。その具体例を、以下に説明する。

[0079] ＡＦＰ－Ｌ３（コアフコースの転移したαフェトプロテイン）の確度の高い検出は、臨床的に肝硬変に合併する肝細胞癌の早期診断、肝細胞癌の緻密な経過観察、治療効果の正確な判定、胎児性腫瘍の早期発見、劇症肝炎の肝再生の指標等として有用である。コアフコースの転移したα５β１インテグリンもまた、肝癌診断の指標として期待される。

[0080] 大腸癌で悪性度の低いものや原発癌では、コアフコースを含むフコース全般が増加する。一方、大腸癌の悪性度が高いものや転移癌では、α１→６結合フコースが減少する傾向がある。そこで、一次スクリーニングで大腸癌と診断された者の大腸癌の腫瘍組織に合成スギタケレクチンを作用させ、α１

→６結合フコースの量を調べることで、悪性度の高い大腸癌や転移癌の判別が可能となる。

[0081] 膵臓癌になると、糖タンパク質であるハプトグロビンにコアフコースが付加したフコシル化ハプトグロビンが生成する。このフコシル化ハプトグロビンは、膵臓癌の病期の進展とともに増え、膵臓癌の腫瘍部摘出後には消失する。合成スギタケレクチンとフコシル化ハプトグロビンとの反応に本発明の界面活性剤を含む溶液を使用することにより、合成スギタケレクチンによる検出感度を高めることができる。さらに、合成スギタケレクチンと抗ハプトグロビン抗体を用いたアッセイによれば、膵臓癌を迅速かつ簡便に検出することが可能である。さらに、膵臓癌マーカーＣＡ１９－９の抗体と合成スギタケレクチンとを組み合わせることで膵臓癌と膵炎との判別が可能である。

[0082] 本発明の測定方法は、上記の疾患の診断や研究のほかに、前立腺癌、乳癌、胃癌、小腸癌、結腸直腸癌、腎細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、軟部肉腫、骨肉腫、メラノーマ、膠芽腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、急性リンパ腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病等の腫瘍；アレルギー疾患；自己免疫疾患；並びに肺気腫等の循環器疾患の診断や研究に使用することが期待される。

実施例

[0083] 以下に実施例及び比較例を示すことにより、本発明をより詳細に説明する。しかし、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

〔実施例１〕化学合成ＰｈｏＳＬの前処理による親和性の向上試験（１）

１．材料

配列番号２に示すアミノ酸配列をもつＰｈｏＳＬをＦｍｏｃ法により化学合成した。得られた合成ＰｈｏＳＬをＥＬＩＳＡ試験に使用した。

ＥＬＩＳＡに使用するタンパク質として、ウシチログロブリン（ｂＴＧ、シグマアルドリッチ社製）を用意した。

界面活性剤は、表２に示すものを用意した。

[表2]

界面活性剤	入手先
TritonX－100 (オクチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)	MP Biomedicals
CTAB(ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド)	タカラバイオ(株)
SB3－14(ミリスチルスルホベタイン)	タカラバイオ(株)
Tween20	ナカライテスク(株)
Tween40	東京化成工業(株)
Tween60	東京化成工業(株)
Tween80	東京化成工業(株)
NP－40 (ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル)	New England Biolab
オクチルグルコシド	同仁化学(株)

緩衝液等は以下のように調製した。

＜リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）＞

リン酸水素二ナトリウム５．７５ｇ、リン酸二水素カリウム１．０ｇ、塩化カリウム１．０ｇ、及び塩化ナトリウム４０．０ｇを、水５Ｌに溶解して、ＰＢＳを得た。

＜ＰＢＳ－Ｔ＞

ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート（商品名　Ｔｗｅｅｎ２０）２．５ｍＬを、５ＬのＰＢＳに溶解して、濃度０．０５％のＴｗｅｅｎ２０のＰＢＳ溶液（以下、ＰＢＳ－Ｔという）を得た。

＜１％　ＢＳＡ／ＰＢＳ＞

ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、シグマアルドリッチ社製）１ｇを、１００ｍＬのＰＢＳに溶解して、濃度１％のＢＳＡのＰＢＳ溶液（以下、１％　ＢＳＡ／ＰＢＳという）を得た。

[0084] ２．合成ＰｈｏＳＬの前処理

合成ＰｈｏＳＬの粉末約０．２ｍｇを１．５　ｍＬチューブに入れ、１００μＬの水に溶解させた。ブラッドフォード法のタンパク質定量用試薬（製品名Ｐｒｏｔｅｉｎ　ａｓｓａｙ、バイオラッド社製）を用いて、合成ＰｈｏＳＬ溶液の濃度を定量した。なお、定量に用いる標準物質には、ウシ血清

アルブミン（ＢＳＡ）（製品名ＢＳＡスタンダード、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を使用した。定量後、合成ＰｈｏＳＬ溶液を、水で濃度１ｍｇ／ｍＬになるように希釈した。上記希釈溶液と界面活性剤の水溶液とを混合し、合成ＰｈｏＳＬ（濃度１００μｇ／ｍＬ）、界面活性剤濃度０．１重量％とした合成ＰｈｏＳＬ含有界面活性剤溶液（以下、前処理液という）を調製した。上記前処理液をボルテックスで撹拌後、２５℃で１８時間、静置させた。反応後、前処理液をＥＬＩＳＡ試験に供した。

[0085] ３．ＥＬＩＳＡ

合成ＰｈｏＳＬとそれに親和性を有するウシチログロブリン（ｂＴＧ）との結合試験をＥＬＩＳＡ（直接法）で測定した。

（１）ｂＴＧ固相化

ｂＴＧ溶液をブラッドフォード法で定量し、ＰＢＳで５００ｎｇ／ｍＬに調製した。このｂＴＧ溶液２５μＬを９６穴マイクロタイタープレートのウェルに添加して、４℃で２時間静置した。その後、添加液を廃棄することにより、ｂＴＧを固相化した。

（２）ブロッキング

上記ウェルを１５０μＬのＰＢＳ－Ｔで１回洗浄し、その後、上記ウェルに１％ＢＳＡ／ＰＢＳを６０μＬ添加して、３７℃で１時間放置した。その後、添加液を廃棄した。

（３）レクチン反応

上記ウェルを１５０μＬのＰＢＳ－Ｔで洗浄した。前処理液をＰＢＳで１／１００に希釈することにより、合成ＰｈｏＳＬの濃度が１μｇ／ｍＬの前処理液を調製した。前記前処理液を２５　μＬ、上記ウェルに添加し、４℃で３０分間反応させた。その後、添加液を廃棄した。

（４）一次抗体反応

上記ウェルにＰＢＳ－Ｔを１５０μＬ添加し、添加液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。上記ウェルに、一次抗体として抗ＰｈｏＳＬウサギポリクローナル抗体（０．５μｇ／ｍＬ）を２５μＬ添加して、４℃で３

０分間放置した。その後、添加液を廃棄した。

（５）二次抗体反応

上記ウェルにＰＢＳ－Ｔを１５０μＬ添加し、添加液を廃棄した。この操作を合計３回繰り返した。上記ウェルに、二次抗体としてＨＲＰ標識抗ウサギＩｇＧヤギ抗体（濃度０．５　μｇ／ｍＬ）を２５μＬ添加し、４℃で３０分間放置した。その後、添加液を廃棄した。

（６）発色反応

上記ウェルにＰＢＳ－Ｔを１５０μＬ添加し、添加液を廃棄した。この操作を合計４回繰り返した。Ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｂｅｎｚｉｄｉｎｅ（ＴＭＢ）及び過酸化水素からなるＴＭＢ　Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｓｙｓｔｅｍ　（ＫＰＬ社製）を用いて、使用マニュアルに沿って、発色反応をおこなった。

（７）吸光度測定

１Ｍ　リン酸で発色反応を停止後、プレートリーダー（製品名Ｐｏｗｅｒｓｃａｎ（登録商標）　ＨＴ、　ＢｉｏＴｅｋ社製）で４５０ｎｍ及び６００ｎｍの吸光度（ＯＤ）を測定した。OD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{bTG(+)}$とした。シグナル値は、実験反復値の平均値である。こうして得られるシグナル値を、合成ＰｈｏＳＬ前処理有りの場合、$シグナル値_{前処理有り}$、そして前処理未実施の場合、$シグナル値_{前処理無し}$とした。$シグナル値_{前処理有り}$の$シグナル値_{前処理無し}$に対する変化率を、表３に示す。

[0086]

[表3]

	界面活性剤	シグナル変化率[1)]
比較例1	TritonX－100	0．56
比較例2	CTAB	0．56
比較例3	SB3－14	0．25
実施例1	Tween20	1．34

1)シグナル変化率＝$シグナル値_{前処理有り}$／$シグナル値_{前処理無し}$

[0087]　表３を見ると、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００（非イオン系界面活性剤の一種）

やＣＴＡＢ及びＳＢ３－１４（陽イオン界面活性剤の一種）の界面活性剤からなる溶液中で合成ＰｈｏＳＬを前処理した場合、合成ＰｈｏＳＬの糖鎖への親和性は、前処理未実施と比べて低下する。一方、Ｔｗｅｅｎ２０（非イオン系界面活性剤の一種）で前処理した場合（実施例１）には、合成ＰｈｏＳＬの糖鎖への親和性が向上することが確認された。

[0088] 〔実施例２～２３〕化学合成ＰｈｏＳＬの前処理による親和性の向上試験（２）

実施例１で効果を確認したＴｗｅｅｎ系界面活性剤の濃度依存性を調べた。具体的には、実施例１において、以下に示す事項以外は、実施例１と同様の操作により、ＥＬＩＳＡ試験を実施した。

２．前処理において、界面活性剤及びその濃度を表４に示されるように変更した。

３－（４）．一次抗体濃度を０．５μｇ／ｍＬから０．２μｇ／ｍＬに変更した。

３－（５）．二次抗体濃度を０．５μｇ／ｍＬから０．２μｇ／ｍＬに変更した。

３－（７）．実験反復回数を６回とし、上位及び下位の１つを除外し、平均値を算出した。　シグナル値の変化率を、表４に示す。

[0089]

[表4]

	界面活性剤	濃度(重量%)	シグナル変化率1)
実施例2	Tween20	0.01	1.58
実施例3		0.05	1.51
実施例4		0.1	2.56
実施例5		0.5	2.49
実施例6		1.0	2.58
実施例7		5.0	1.93
実施例8	Tween40	0.01	1.54
実施例9		0.05	2.17
実施例10		0.1	2.44
実施例11		0.5	1.83
実施例12		1.0	1.77
実施例13		5.0	1.04
実施例14	Tween60	0.01	1.36
実施例15		0.05	2.04
実施例16		0.1	2.24
実施例17		0.5	1.68
実施例18		1.0	1.44
実施例19		5.0	1.68
実施例20	Tween80	0.01	1.14
実施例21		0.05	1.40
実施例22		0.1	1.55
実施例23		0.5	1.24

1)シグナル変化率＝シグナル値$_{前処理有り}$／シグナル値$_{前処理無し}$

[0090] 表４から、合成ＰｈｏＳＬを、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ６０及びＴｗｅｅｎ８０のいずれかの溶液に浸漬することにより、合成ＰｈｏＳＬの糖鎖への親和性は、未処理と比べて少なくとも１．０４倍、最大２．５８倍増強することが判明した。これらの中で、Ｔｗｅｅｎ２０は、適用濃度を低くできる点で、好ましいといえる。

[0091] 〔実施例２４～３１〕化学合成ＰｈｏＳＬの前処理による親和性の向上試験（３）

Ｔｗｅｅｎ系界面活性剤以外の界面活性剤について、親和性向上作用のあるものを探索した。具体的には、実施例１において、以下に示す事項以外は、実施例１と同様の操作により、ＥＬＩＳＡ試験を実施した。

２．前処理において、界面活性剤及びその濃度を表５に示されるように変更した。

２．前処理において、静置時間を１時間とした。

３－（１）．固相化ｂＴＧ濃度を５００ｎｇ／ｍＬから１０００ｎｇ／ｍＬに変更した。

３－（７）．実験反復回数を８回とし、上位及び下位の２つを除外し、平均値を算出した。

[0092] 界面活性剤によるＰｈｏＳＬの前処理区では、OD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{bTG(+)}$とし、合成ＰｈｏＳＬ未添加（界面活性剤のみ）でのOD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{PhoSL(-)}$とした。そして、$OD_{bTG(+)}$から$OD_{PhoSL(-)}$を引いた値をシグナル値$_{前処理有り}$とした。同様に、界面活性剤によるＰｈｏＳＬの未処理区の場合のシグナル値を、シグナル値$_{前処理無し}$とした。シグナル変化率の測定結果を表５に示す。

[0093]

[表5]

	界面活性剤	濃度(重量%)	シグナル変化率[1)]
実施例24	NP－40	0.05	1.42
実施例25		0.10	1.52
実施例26		1.0	1.67
実施例27		5.0	2.40
実施例28	オクチルグルコシド	0.05	1.05
実施例29		0.10	1.12
実施例30		1.0	1.64
実施例31		5.0	1.60

1)シグナル変化率＝シグナル値$_{前処理有り}$／シグナル値$_{前処理無し}$

[0094] 表５から、ＮＰ－４０又はオクチルグルコシドからなる界面活性剤溶液中で合成ＰｈｏＳＬを養生することにより、合成ＰｈｏＳＬの糖鎖への親和性が向上する。その効果は、界面活性剤濃度に依存して増強される。

[0095] 〔実施例３２～３５〕化学合成ＰｈｏＳＬの前処理による親和性の向上試験（４）

アミノ酸改変合成ＰｈｏＳＬを作成し、それを界面活性剤で前処理したと

きの糖鎖への親和性を評価した。具体的には、実施例１において、以下に示す事項以外は、実施例１と同様の操作により、ＥＬＩＳＡ試験を実施した。

２．合成ＰｈｏＳＬを、配列番号３に示すアミノ酸改変ＰｈｏＳＬに変更した。

２．前処理において、界面活性剤及びその濃度を表６に示されるように変更した。

２．前処理において、静置時間を１時間とした。

３－（１）．固相化ｂＴＧ濃度を５００ｎｇ／ｍＬから１０００ｎｇ／ｍＬに変更した。

３－（７）．実験反復回数を８回とし、上位及び下位の２つを除外し、平均値を算出した。

[0096] 界面活性剤によるＰｈｏＳＬの前処理区では、OD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{bTG(+)}$とし、合成ＰｈｏＳＬ未添加（界面活性剤のみ）でのOD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{PhoSL(-)}$とした。そして、$OD_{bTG(+)}$から$OD_{PhoSL(-)}$を引いた値をシグナル値$_{前処理有り}$とした。同様に、界面活性剤によるＰｈｏＳＬの未処理区の場合のシグナル値を、シグナル値$_{前処理無し}$とした。ＥＬＩＳＡ試験でのシグナル変化率の測定値を表６に示す。

[0097]

[表6]

	Tween20界面活性剤の濃度(重量%)	シグナル変化率[1)]
実施例32	0.05	1.56
実施例33	0.10	1.70
実施例34	1.0	1.78
実施例35	5.0	1.80

1)シグナル変化率＝シグナル値$_{前処理有り}$／シグナル値$_{前処理無し}$

[0098] 表６の結果から、配列番号２中の１個のアミノ酸が置換され、かつ糖結合活性を有するアミノ酸改変ペプチドをＴｗｅｅｎ２０で前処理にすると、合成ＰｈｏＳＬの糖タンパク質の親和性が向上することが確認された。

[0099] 〔実施例３６〕遺伝子工学的合成ＰｈｏＳＬの前処理による親和性の向上試験

実施例１において、以下の点を変更した以外は、実施例１と同様の操作を行った。

２．前処理において、合成ＰｈｏＳＬを、遺伝子組換えＦＬＡＧタグ付きＰｈｏＳＬ（表７に示す配列番号１８）に変更した。この遺伝子組換えＦＬＡＧタグ付きＰｈｏＳＬは、配列番号１７にＨｉｓタグとＦＬＡＧタグを付加し、さらにＮ末端に遺伝子発現させるためのＭ（メチオニン）を付加したものである。この遺伝子組換えＦＬＡＧタグ付きＰｈｏＳＬは、特許文献２（特許５５３１２９０号）に記載の方法に準じて、大腸菌で発現し、精製したものを使用した。

[表7]

配列番号	アミノ酸配列	注釈
18	MAPVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDYGDGKWVAQWDTAVFHTTDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAPGFSSISAHHHHHHHHHH	遺伝子組換えFLAGタグ付きPhoSL

２．前処理において、Ｔｗｅｅｎ２０を使用し、その濃度を１．０重量％とした。

２．前処理において、静置時間を１時間とした。

３－（１）．固相化ｂＴＧ濃度を、５００ｎｇ／ｍＬから１０００ｎｇ／ｍＬに変更した。

３－（７）．実験反復回数を８回とし、上位及び下位の２つを除外し、平均値を算出した。

[0100] 界面活性剤によるＰｈｏＳＬの前処理区では、OD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{bTG(+)}$とし、合成ＰｈｏＳＬ未添加（界面活性剤のみ）でのOD_{450nm}からOD_{600nm}を引いた値を$OD_{PhoSL(-)}$とした。そして、$OD_{bTG(+)}$から$OD_{PhoSL(-)}$を引いた値をシグナル値$_{前処理有り}$とした。同様に、界面活性剤によるＰｈｏＳＬの未処理区の場合のシグナル値を、シグナル値$_{前処理無し}$とした。シグナル変化率の測定値を表８に示す。

[表8]

	レクチン	シグナル変化率[1)]
実施例36	遺伝子組換えFLAGタグ付きPhoSL	1．76

1)シグナル変化率＝シグナル値$_{前処理有り}$／シグナル値$_{前処理無し}$

[0101] 表８の結果から、遺伝子工学的手法により得られた合成ＰｈｏＳＬ（遺伝子組換えＦＬＡＧタグ付きＰｈｏＳＬ）においても、Ｔｗｅｅｎ２０で前処理すると、糖鎖への親和性が向上することが判明した。

請求の範囲

[請求項1] 化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンのフコースα１→６糖鎖との親和性を向上させる方法であって、

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に前記合成スギタケレクチンを浸漬するステップを含む、前記合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法。

[請求項2] 前記溶液の界面活性剤濃度が、０．０１～６重量％である、請求項１に記載の合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法。

[請求項3] 前記浸漬の時間が、５分～４８時間である、請求項１に記載の合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法。

[請求項4] 前記合成スギタケレクチンは、配列番号１に示すアミノ酸配列、又は配列番号１中の１又は数個のアミノ酸が置換、付加又は欠失され、かつ糖結合活性を有するアミノ酸改変ペプチドである、請求項１に記載の合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法。

[請求項5] 前記アミノ酸改変ペプチドが、配列番号３～１７のいずれかで示される、請求項４に記載の合成スギタケレクチンの親和性を向上させる方法。

[請求項6] フコースα１→６糖鎖の測定方法であって、

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン（９）オクチルフェニルエーテル、及びオクチルグルコシドからなる群から選ばれる少なくとも一種の界面活性剤を含む溶液に、化学合成又は遺伝子工学的合成により得られる合成スギタケレクチンを浸漬して、前記フコースα１→６糖鎖との親和性が向上した前記合成スギタケレクチンを得るステップ、及び

前記親和性が向上した合成スギタケレクチンと前記フコースα１→６糖鎖とを反応させ、反応したレクチンを検出するステップ

を含む、前記測定方法。

[請求項7] 前記フコースα１→６糖鎖は、担体に固定化されている、請求項６に記載の測定方法。

[請求項8] 前記フコースα１→６糖鎖は、抗体を介して前記担体に固定化されている、請求項７記載の測定方法。

[請求項9] 前記合成スギタケレクチンは、標識されている、請求項６に記載の測定方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/000418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K14/42(2006.01)i, *C07K1/02*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N33/531*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K14/42, C07K1/02, G01N33/53, G01N33/531, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2011/089988 A1 (J-Oil Mills Inc.), 28 July 2011 (28.07.2011), claims; paragraph [0029]; table 1; paragraph [0052]; referential example 1 & US 8481275 B2 claims; column 5, lines 34 to 42; table 1; column 8, lines 23 to 33; example 2 & EP 2498094 A1 & JP 4900983 B & CN 103348247 A & KR 10-2012-0130795 A	6-9 1-5
X A	JP 2011-149826 A (J-Oil Mills Inc.), 04 August 2011 (04.08.2011), claims; paragraph [0042]; table 1; paragraph [0076]; example 1 (Family: none)	6,9 1-5,7-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 May 2017 (17.05.17)	30 May 2017 (30.05.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/000418

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-148735 A (J-Oil Mills Inc.), 04 August 2011 (04.08.2011), claims; examples 2 to 5 (Family: none)	1-9
A	JP 63-126896 A (Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 30 May 1988 (30.05.1988), page 2, upper right column, the last line to lower left column, line 15 (Family: none)	1-9
A	JP 10-174588 A (Seikagaku Corp.), 30 June 1998 (30.06.1998), paragraph [0091] & EP 977036 A1 paragraph [0136] & WO 1998/016825 A1 & CA 2268038 A	1-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０００４１８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/42(2006.01)i, C07K1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K14/42, C07K1/02, G01N33/53, G01N33/531, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2011/089988 A1 (株式会社Ｊ－オイルミルズ) 2011.07.28, 請求の範囲,[0029],表１,[0052]及び参考例１など, & US 8481275 B2, claims, column5 l.34-l.42, TABLE 1, column8 l.23-l.33, example 2, & EP 2498094 A1 & JP 4900983 B & CN 103348247 A & KR 10-2012-0130795 A	6-9 1-5

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１７．０５．２０１７	３０．０５．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９４５１
坂崎　恵美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	JP 2011-149826 A（株式会社Ｊ－オイルミルズ）2011.08.04, 請求の範囲,【0042】, 表１,【0076】及び実施例１, (ファミリーなし)	6,9 1-5,7-8
A	JP 2011-148735 A（株式会社Ｊ－オイルミルズ）2011.08.04, 請求の範囲, 実施例２～５, (ファミリーなし)	1-9
A	JP 63-126896 A（電気化学工業株式会社）1988.05.30, ２頁右上欄末行～左下欄１５行, (ファミリーなし)	1-9
A	JP 10-174588 A（生化学工業株式会社）1998.06.30, 【0091】, & EP 977036 A1, [0136], & WO 1998/016825 A1 & CA 2268038 A	1-9