

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4565237号  
(P4565237)

(45) 発行日 平成22年10月20日 (2010. 10. 20)

(24) 登録日 平成22年8月13日 (2010. 8. 13)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 21/64	(2006. 01)	GO 1 N 21/64	F
GO 1 N 21/78	(2006. 01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 37/00	(2006. 01)	GO 1 N 37/00	1 O 2

請求項の数 14 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2005-184171 (P2005-184171)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成17年6月23日 (2005. 6. 23)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2007-3357 (P2007-3357A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成19年1月11日 (2007. 1. 11)	(72) 発明者	平林 淳
審査請求日	平成19年3月14日 (2007. 3. 14)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
(出願人による申告) 平成15年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「糖鎖エンジニアリングプロジェクト(糖鎖構造解析技術開発)」委託研究 産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	久野 敦
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	内山 昇
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		審査官	白形 由美子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖鎖あるいは複合糖質の解析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験糖鎖あるいは被験複合糖質を、精製又は精製することなく蛍光標識し、糖鎖あるいは複合糖質とタンパク質の結合状態を測定することにより、被験糖鎖あるいは被験複合糖質あるいはこれらを含む試料を解析する装置であって、複数種の糖鎖結合性タンパク質が、導光性材料からなり、かつ複数の反応槽に仕切られた基板上に、配置固定化された糖鎖結合性タンパク質固定化基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて、蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段と、糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定された蛍光強度を、蛍光強度の有無のみではなく、蛍光強度が0の場合を含めて段階分けして記憶する手段とを有することを特徴とする、上記装置。

【請求項2】

糖鎖結合性タンパク質がレクチン又はIgMクラスに属する糖鎖認識抗体であることを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

基板が、糖鎖結合性タンパク質をその種類に応じて所定のパターンで配置固定化したものであることを特徴とする請求項1又は2に記載の装置。

【請求項4】

段階分けされた蛍光強度を、各糖鎖結合性タンパク質の種類毎に区分して表示する手段を有することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の装置。

## 【請求項 5】

被験糖鎖あるいは被験複合糖質を、精製又は精製することなく蛍光標識し、糖鎖あるいは複合糖質とタンパク質の結合状態を測定することにより、被験糖鎖あるいは被験複合糖質あるいはこれらを含む試料を解析する装置であって、導光性材料からなり、かつ複数の反応槽に仕切られた基板上に、複数種の糖鎖結合性タンパク質が配置固定化された基板であって、同一の糖鎖結合タンパク質がその種類毎に複数配置固定化された糖鎖結合性タンパク質固定化基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて、蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段と、同一の糖鎖結合性タンパク質に対して測定された蛍光強度の平均値を段階分けして記憶する手段を有することを特徴とする、上記装置。

10

## 【請求項 6】

上記複数の反応槽が、複数の穴を有するラバーの基板への貼り付けまたは撥水コートによって形成されていることを特徴とする請求項 5 に記載の装置。

## 【請求項 7】

段階分けされた蛍光強度を、糖鎖結合性タンパク質の種類毎に区分して表示する手段を有することを特徴とする、請求項 6 に記載の装置。

## 【請求項 8】

記憶手段に既知の糖鎖あるいは複合糖質に対する蛍光強度情報が記憶されていることを特徴とする、請求項 1、5～7 のいずれか 1 項に記載の装置。

20

## 【請求項 9】

既知の糖鎖あるいは複合糖質に対する蛍光強度情報と解析対象の糖鎖あるいは糖タンパク質の蛍光強度情報を照合し、同一あるいは近似する糖鎖あるいは複合糖質を選定する手段を有することを特徴とする、請求項 8 に記載の装置。

## 【請求項 10】

基板上に糖鎖結合性タンパク質とともに、複合糖質の糖鎖以外の部分に対する抗体が配置固定化されていることを特徴とする、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 11】

基板が、エポキシ基を活性基として含有する化合物がコートされた基板に、糖鎖結合性タンパク質が固定化されたものであることを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の装置。

30

## 【請求項 12】

エポキシ基を活性基として含有する化合物が 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、2-(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、3-グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシランであることを特徴とする、請求項 11 に記載の装置。

## 【請求項 13】

エポキシ基を活性基として含有する化合物が分岐したスパーサーの先端にエポキシ基を一つ又は複数持つシランカップリング化合物であることを特徴とする、請求項 12 に記載の装置。

40

## 【請求項 14】

スパーサーが炭化水素鎖、ポリエチレングリコール、タンパク質、またはビオチン・アビジンであることを特徴とする、請求項 13 に記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エバネッセント光を利用した糖鎖あるいは複合糖質、又はこれらを含む試料の解析装置及び該装置に装着して使用する基板に関する。

## 【背景技術】

50

## 【0002】

生体の生命機能を担う主役であるタンパク質が、細胞社会の中において秩序正しく機能を発揮するためには、糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾が大変に重要な役割を担っている。生体内のほとんどのタンパク質は糖鎖による修飾をうけており、タンパク質に付加した糖鎖がウィルスの感染、原虫の寄生、感染、毒素の結合、ホルモンの結合、受精、発生分化、タンパク質の安定性、がん細胞転移、アポトーシスなど、生命現象の様々な場で重要な役割を果たしていることが近年次々と明らかになってきた。

## 【0003】

糖鎖機能の解析のためには、まずその糖鎖の構造解析が欠かせない。今後も糖鎖構造解析法の重要性は増すことが予想される。しかし糖鎖の構造解析は多大な時間と労力、経験を要することから、従来の手法に基づき完全な構造決定を目指すのではなく、より簡便に、高速、高感度、かつ高精度に多彩な糖鎖構造の特徴を抽出し、相互識別できるシステム開発が期待されていた。

10

## 【0004】

マイクロアレイは多種のDNA・タンパク質等の固定化試料を高密度に固相担体（ガラス・メンブレン・シリコンチップ）上にスポット状に固定化したものの総称であり、固定化した多種の試料スポットに対して特異的に結合する分子（以下プローブ）の有無を検出することが可能である。プローブ分子には一般的には蛍光標識化されたものが用いられており、プローブ溶液をアレイ表面と反応させた後に、蛍光検出スキャナーで観察することにより各試料スポットに結合したプローブ分子の定量的解析を行うことができる。米国Affi 20

20

## 【0005】

第三の生命鎖と呼ばれる糖鎖の構造・機能情報を研究する上で、マイクロアレイを利用した糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質（糖結合性タンパク質、例えば、レクチン等）の迅速かつ高感度な大規模相互作用解析が可能となれば、基礎研究から医療診断や産業応用に至るまで、広範囲に利用されうる非常に有用なツールになることが考えられる。

## 【0006】

糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質間の結合は抗原抗体反応の一般的な解離定数（ $K_d = 10^{-8}$  M以下）等に比べて、一般的に弱い相互作用であることが知られており、これらの解離定数（ $K_d$ ）は $10^{-6}$  Mかそれ以上であることが多い。また糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質間の結合は比較的速い解離-会合反応から成り立っていることが知られており、結果的に一般的なタンパク質間相互作用や相補的ヌクレオチド断片間の相互作用に比べ、洗浄操作などにより解離側に平衡が傾きやすい。例えば、レクチンを糖タンパク質固定化カラム等にて精製を行う際にも、レクチンの結合が弱い場合は洗浄操作中にレクチンがカラム外に流出してしまう現象がしばしば観察される。

30

## 【0007】

従来のスライドガラスを用いた一般的なマイクロアレイ技術では、プローブ溶液を固定化試料と接触させて結合反応に至らしめる過程後にプローブ溶液を洗浄・除去し、ジェットガスや遠心機を用いてスライドガラスに付着している水分を完全に除去する操作を行った後に、マイクロアレイスキャナーを用いてイメージングを行う。これは一般的なマイクロアレイリーダーが、水分の付着した状態でスライドガラス上の蛍光を観察することが出来ないことに起因している。このようにスキャンの前段階でプローブ溶液を除去しても、相補的ヌクレオチド断片や抗原-抗体反応等、強い結合を示す相互作用においては解離速度定数が十分に小さいため、プローブ分子の解離反応は容易に進行しないと考えられる。しかし、糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質間に一般的に見られる解離速度定数の大きい、すなわち弱い相互作用の観察に際しては、プローブ溶液の除去・洗浄操作を行う時点で糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質間の解離反応が進行してしまい、平衡状態下での正確な相互作用情報を得ることが困難になる。このため、マイクロアレイにおいて糖鎖と糖鎖に相互作用を示すタンパク質間の平衡状態での相互作用情報を精密に解析す

40

50

る場合、このプローブ溶液の洗浄操作が大きな問題点となる。

【0008】

DNAマイクロアレイは現在非常に広範囲に利用されている。タンパク質のマイクロアレイについてもDNAの転写産物であるタンパク質の生体内での機能を解明する等の基礎研究分野やタンパク質の量的・質的な変化に基づいた診断・判断等の応用分野においても、将来の利用が期待されており、研究面においても世界中で活発な研究が行われてきた。しかしタンパク質マイクロアレイの開発・普及はDNAマイクロアレイに比べ、圧倒的に遅れているのが現状である。この原因の一つとして、様々に異なる性質を持つタンパク質試料を、活性を保ったままの状態、一定の割合で固定化していくという工程が技術的に大変に難しいということが、以前より多くの研究者によって指摘されている。

10

【0009】

タンパク質をアレイ上に固定化する方法として、最も初期に開発された方法としてPVDF膜（非特許文献1）に代表されるメンブレン上にタンパク質を物理的に吸着させる方法が挙げられる。転写因子など一部のタンパク質では、ある程度の活性を維持できると報告されているが、一般性には乏しい。またメンブレン上に固定化する場合、アレイの高密度化に限界があった。高密度化を達成するために、金属やガラスなどの固体表面に対してタンパク質を固定化していく方向で研究が進められてきたが、一般にタンパク質は金属やガラスなどの固体表面への接触によって変性しやすいという性質を持つ。このため、固体表面とタンパク質を架橋するための何らかのリンカーを使用する固定化方法が、鋭意研究・開発されてきた。

20

【0010】

タンパク質の変性の問題を軽減する手法の一例としては、スライドガラス上に厚さ10~100 μmのポリアクリルアミドのパッドを接合して、これにタンパク質をスポットする手法が挙げられる（非特許文献2および3）。この場合、タンパク質は3次元空間に固定化されるために、2次元表面に固定化する手法に比べて、量的に100倍以上の向上が望めるといえる。また、タンパク質を多孔性ポリアクリルアミドゲル内にアミノ基を介して固定化する方法もある（非特許文献4）。しかしこれらの方法は高価で特殊なスライドガラスを製作する必要があり、一般的な普及には至っていない。また固定化されたタンパク質の層に厚みがあることは、検出法によっては好ましくないこともある。

【0011】

現在最も精力的に研究されている固相へのタンパク質固定化法として、何らかのタグを付加した形でタンパク質を発現し、タンパク質のタグ部分を介した固相担体への固定化を行う方法がある。この方法ではタンパク質の有効リガンド濃度が向上するといった効果やタンパク質の向きをそろえることが原理的に可能であるといわれている。このような手法の一例として、オリゴヒスチジンタグを介して、ニッケル錯体で表面修飾した基板へ固定化する方法や（非特許文献5）、アビジン-ビオチンを介した固定化法（特許文献1）を挙げることができる。

30

【0012】

このような方法はタンパク質の活性を保ったまま固定化する、あるいは固定化率をそろえるという点で有効な方法であると考えられる。しかしマイクロアレイに固定化しようとするすべてのタンパク質について遺伝子レベルでタグを付加し、大腸菌、ないし無細胞系等で発現及び精製を行うことは多額のコストと莫大な労力が必要となると考えられる点で、現時点で一般的な研究者が自在かつ個々の要求に合わせる形で気軽に利用することは難しい。

40

【0013】

これに対し、タンパク質の官能基を固相担体との固定化に利用する方法は、天然から抽出したままのタンパク質や市販のタンパク質試料をそのまま固定化し、マイクロアレイに利用できるという特徴をもつ。タンパク質中のアミノ基を介した固相担体への固定化方法としては、固相表面に結合させた活性エステル基を介してタンパク質を固定化する方法や、固相表面に配置したエポキシ基を介してタンパク質を固定化する手法が挙げられる（非

50

特許文献6)。タンパク質のアミノ基を介して固定化する方法はシンプルな方法であるが、市販のタンパク質や生体抽出・成分、特定のタグのない組み換えタンパク質等においても簡便に固定化することができるため、個々の使用者が自分の目的に合わせ、自在にタンパク質を選択し、迅速かつ安価に目的にあったマイクロアレイに最適化して使用することができる。タンパク質のアミノ基を介した固定化方法の欠点としては、タンパク質中のリジン残基の数が個々のタンパク質によって異なることや、固定化に用いられるリジン残基の位置によってはタンパク質の不活化が起こる可能性等が挙げられる。

【0014】

【特許文献1】特許出願2001-520104

【特許文献2】特許公開平8-201383

【特許文献3】特許公表2002-544485

【非特許文献1】L. J. Holt, K. Bussow, G. Walter, I. M. Tomlinson, *Nucleic Acids Res.*, 15, E72, 2000

【非特許文献2】D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, 250, 203-211, 1997

【非特許文献3】A. Lueking, M. Horn, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach, G. Walter, *Anal. Biochem.*, 270, 103-111, 1999

【非特許文献4】P. Mitchell, *Nat. Biotechnol.*, 20, 225-229, 2002

【非特許文献5】H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science*, 293, 2101-2105, 2001

【非特許文献6】H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genetics*. 26, 283-289, 2000

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、より簡便に、高速、高感度、かつ高精度に糖鎖あるいは複合糖質、又はこれらを含む試料を解析する装置及び該装置に装着するマイクロアレイ基板を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。

その結果、糖鎖結合性タンパク質としてレクチンを使用して、該レクチンを表面に複数配置固定した基板と、該基板上的レクチンと蛍光標識された糖鎖あるいは糖タンパク質との結合状態を測定するための励起光としてエバネッセント波を利用した、糖鎖あるいは複合糖質の解析装置を製作し、実際に糖鎖あるいは複合糖鎖含有試料の解析を行った。

従来のレクチンプロット法によれば、レクチンと結合しなかった蛍光標識された糖鎖等の洗浄工程が必要となるが、本発明の解析装置によれば、このような洗浄工程は不要で、簡便、高速に解析可能であり、しかも従来のレクチンプロットのような結合の有無(0か1か)のみではなく、中間部分の情報、すなわち結合の強度情報を蛍光強度値から得ることができ(例えば0から6段階)、高感度、高精度であることを確認し、本発明を完成させた。

【0017】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 被験糖鎖あるいは被験複合糖質を、精製又は精製することなく蛍光標識し、糖鎖あるいは複合糖質とタンパク質の結合状態を測定することにより、被験糖鎖あるいは被験複合糖質あるいはこれらを含む試料を解析する装置であって、複数種の糖鎖結合性タンパク質が、導光性材料からなり、かつ複数の反応槽に仕切られた基板の上に、配置固定された糖鎖結合性タンパク質固定化基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面

10

20

30

40

50

にエバネッセント波を発生させて、蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段と、糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定された蛍光強度を、蛍光強度の有無のみではなく、蛍光強度が0の場合を含めて段階分けして記憶する手段とを有することを特徴とする、上記装置。

(2) 糖鎖結合性タンパク質がレクチン又はIgMクラスに属する糖鎖認識抗体であることを特徴とする、上記(1)に記載の装置。

(3) 基板が、糖鎖結合性タンパク質をその種類に応じて所定のパターンで配置固定化したものであることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の装置。 10

(4) 段階分けされた蛍光強度を、各糖鎖結合性タンパク質の種類毎に区分して表示する手段を有することを特徴とする、上記請求項(1)~(3)のいずれかに記載の装置。

(5) 被験糖鎖あるいは被験複合糖質を、精製又は精製することなく蛍光標識し、糖鎖あるいは複合糖質とタンパク質の結合状態を測定することにより、被験糖鎖あるいは被験複合糖質あるいはこれらを含む試料を解析する装置であって、導光性材料からなり、かつ複数の反応槽に仕切られた基板上に、複数種の糖鎖結合性タンパク質が配置固定化された基板であって、同一の糖鎖結合タンパク質がその種類毎に複数配置固定化された糖鎖結合性タンパク質固定化基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて、蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段と、同一の糖鎖結合性タンパク質に対して測定された蛍光強度の平均値を段階分けして記憶する手段を有することを特徴とする、上記装置。 20

(6) 上記複数の反応槽が、複数の穴を有するラバーの基板への貼り付けまたは撥水コートによって形成されていることを特徴とする上記(5)に記載の装置。

(7) 段階分けされた蛍光強度を、糖鎖結合性タンパク質の種類毎に区分して表示する手段を有することを特徴とする、上記(6)に記載の装置。 30

(8) 記憶手段に既知の糖鎖あるいは複合糖質に対する蛍光強度情報が記憶されていることを特徴とする、上記(1)、(5)~(7)のいずれかに記載の装置。

(9) 既知の糖鎖あるいは複合糖質に対する蛍光強度情報と解析対象の糖鎖あるいは糖タンパク質の蛍光強度情報を照合し、同一あるいは近似する糖鎖あるいは複合糖質を選定する手段を有することを特徴とする、上記(8)に記載の装置。

(10) 基板上に糖鎖結合性タンパク質とともに、複合糖質の糖鎖以外の部分に対する抗体が配置固定化されていることを特徴とする、上記(1)~(9)のいずれかに記載の装置。 40

(11) 基板が、エポキシ基を活性基として含有する化合物がコートされた基板に、糖鎖結合性タンパク質が固定化されたものであることを特徴とする、上記(1)~(10)のいずれかに記載の装置。

(12) エポキシ基を活性基として含有する化合物が3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、2-(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、3-グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシランである 50

ことを特徴とする、上記(11)に記載の装置。

(13) エポキシ基を活性基として含有する化合物が分岐したスペーサーの先端にエポキシ基を一つ又は複数持つシランカップリング化合物であることを特徴とする、上記(12)に記載の装置。

(14) スペーサーが炭化水素鎖、ポリエチレングリコール、タンパク質、またはビオチン・アビジンであることを特徴とする、上記(13)に記載の装置。

【発明の効果】

【0018】

本発明の解析装置により、レクチン等の糖鎖結合性タンパク質と糖鎖間の平衡状態での相互作用情報を精密に解析する上での大きな問題点であったプローブ溶液の洗浄除去操作が不要となり、従来法では洗浄時に洗い流されてしまうような弱い相互作用をも検出することが可能となった。

すなわち、糖鎖結合性タンパク質 - 糖鎖間の相互作用を溶液中で平衡状態のまま観察する手段が初めて実用化された。この装置の使用により、従来のレクチンプロットのような結合の有無(0か1か)ではなく、中間部分の情報、すなわち結合の強度情報を得ることができる(例えば0から6段階)。このことはn種の糖鎖結合性タンパク質 - 糖鎖間の相互作用において、従来は2<sup>n</sup>通りであった情報量が6<sup>n</sup>通りへと格段に増したことを意味する。この技術は今後さらに高密度化、高精度化していくことにより糖鎖構造解析、及び関連するその他の糖鎖工学諸分野の発展に大きな貢献をもたらす。さらには、様々な用途に向け糖鎖結合性タンパク質 - 糖鎖間の相互作用解析用のアレイを作製することで、例えば、血液・体液・組織抽出物等の原液または希釈溶液等の生体試料中の糖タンパク質の糖鎖及びその量比等を解析することにより、種々疾病の診断・判定へ利用でき、また、糖タンパク質製剤の品質管理等への広い応用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明は、糖鎖あるいは複合糖質と糖鎖結合性タンパク質との相互作用を測定し、糖鎖あるいは複合糖質を解析する装置に関する。本発明の装置は、試料中の糖鎖あるいは複合糖質あるいはこれらを含有する試料の解析装置であって、糖鎖結合性タンパク質を複数種配置固定した導光性材料からなる基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段とを有する。

【0020】

本発明の装置による解析対象となる糖鎖あるいは複合糖質については特に制限はないが、糖鎖としては、例えば、糖タンパク質系糖鎖(N-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖)、糖脂質系糖鎖、グリコサミノグリカン系糖鎖、又は多糖類由来オリゴ糖鎖などが挙げられる。又、1)N-結合型糖鎖としては、高マンノース型・混成型・複合型からなるN-結合型糖鎖など、2)O-結合型糖鎖としては、ムチン型(O-GalNAc)・O-Fuc型・O-Man型・O-Glc型などからなるO-結合型糖鎖など、3)糖脂質系糖鎖としては、ガングリオ系列・グロボ系列・ラクト・ネオラクト系列糖鎖など、4)グリコサミノグリカン系糖鎖としては、ヒアルロン酸・ケラタン硫酸・ヘパリン・ヘパラン硫酸・コンドロイチン硫酸・デルマトン硫酸など、5)多糖類由来オリゴ糖鎖としては、キチン、セルロース、カードラン、ラミナリン、デキストラン、デンプン、グリコーゲン、アラビノガラクトン、アルギン酸、フルクタン、フコイダン、キシランなどに由来するオリゴ糖鎖などが例示できる。

【0021】

その他の糖鎖としては、M3・M5A・Hybrid (monoagalacto,bisect)・NA1・NA1(1-6Fuc)・NA2 (monoagalacto)・NA2 (monoagalacto, bisect)・NA2・NA2 (1-6Fuc)・A2・NA2 (bisect)・NA3・NA3 (1-6Fuc)・NA4・NA4 (1-6Fuc)・NA5 (pentaagalacto, bisect)

・ Lactose ・ GA2 ・ GA1 ・ GM3-NeuAc ・ GM3-NeuGc ・ GM1 ・ GM2 ・ GD1a ・ GD1b ・ GD3 ・ Gb3 ・ Gb4 ・ Forssman ・ LNT ・ LNT ・ Galili pentasaccharide ・ B-hexasaccharide ・ LNFP-I ・ LNFP-II (Le<sup>a</sup>) ・ LNFP-III (Le<sup>x</sup>) ・ LNFP-II (Le<sup>b</sup>) ・ A-hexasaccharide ・ A-heptasaccharide ・ B-pentasaccharide ・ 6'-Sialyl lactose ・ pLNH ・ GalLac ・ Gal<sub>2</sub>Lac ・ LN3 ・ GN3 ・ GN4 ・ malto triose ・ Sialyl Le<sup>x</sup>などを挙げることができる。

#### 【 0 0 2 2 】

また、本発明において、複合糖質とは、糖鎖を持つ生体内高分子の総称である。本発明の複合糖質としては、糖タンパク質（糖ペプチドも含む）、プロテオグリカン、糖脂質が挙げられる。

10

#### 【 0 0 2 3 】

基板に固定する糖鎖結合性タンパク質としては、例えばレクチンが好ましく、レクチンとしては、動・植物、真菌、細菌、ウィルスなどから得られる様々な分子家系に属するレクチン、すなわち、細菌を含むすべての生物界で見出されるリシンB鎖関連の「R型レクチン」、真核生物全般に存在し糖タンパク質のフォールディングに関与する「カルネキシン・カルレティキュリン」、多細胞動物に広く存在し、「セレクチン」、「コレクチン」等代表的なレクチンを多く含むカルシウム要求性の「C型レクチン」、動物界に広く分布しガラクトースに特異性を示す「ガレクチン」、植物豆科で大きな家系を形成する「豆科レクチン」、およびこれと構造類似性をもち動物細胞内輸送に関わる「L型レクチン」、リソソーム酵素の細胞内輸送に関わるマンノース6-リン酸結合性の「P型レクチン」、グリコサミノグリカンをはじめとする酸性糖鎖に結合する「アネキシン」、免疫グロブリン超家系に属し「シグレック」を含む「I型レクチン」などが挙げられる。

20

#### 【 0 0 2 4 】

その他のレクチンとしては、ACA（センニンコクレクチン）・BPL（ムラサキモクワンジュレクチン）・ConA（タチナタマメレクチン）・DBA（Horsegramレクチン）・DSA（ヨウシュチョウセンアサガオレクチン）・ECA（デイゴマメレクチン）・EEL（Spindle Treeレクチン）・GNA（ユキノハナレクチン）・GSL I（グリフォニアマメレクチン）・GSL II（グリフォニアマメレクチン）・HHL（アマリリスレクチン）・ジャカリン（ジャックフルーツレクチン）・LBA（リママメレクチン）・LCA（レンズマメレクチン）・LEL（トマトレクチン）・LTL（ロータスマメレクチン）・MPA（アメリカハリグワレクチン）・NPA（ラッパズイセンレクチン）・PHA-E（インゲンマメレクチン）・PHA-L（インゲンマメレクチン）・PNA（ピーナッツレクチン）・PSA（エンドウレクチン）・PTL-I（シカクマメレクチン）・PTL-II（シカクマメレクチン）・PWM（ヨウシュヤマゴボウレクチン）RCA120（ヒママメレクチン）・SBA（ダイズレクチン）・SJA（エンジュレクチン）・SNA（セイヨウニワトコレクチン）・SSA（ニホンニワトコレクチン）・STL（ジャガイモレクチン）・TJA-I（キカラスウリレクチン）・TJA-II（キカラスウリレクチン）・UDA（Common Stinging Nettleレクチン）・UEA I（ハリエニシダレクチン）・VFA（ソラマメレクチン）・VVA（ヘアリーベッチレクチン）・WFA（フジレクチン）・WGA（パンコムギレクチン）などを挙げることができる。

30

#### 【 0 0 2 5 】

また基板に固定するレクチンは、上記レクチンを部位特異的変異導入や化学修飾などの方法で物性や結合特異性、および親和力などを改変したものも挙げられ、本明細書でいうレクチンとしてはこのようなレクチン変異体も包含する。さらに本発明は抗原 - 抗体反応などに比べ比較的弱い糖鎖 - タンパク質間の相互作用を解析することを可能にする装置であり、相互作用の弱い糖鎖結合性タンパク質はレクチンに限定されるものではない。すなわち一般的に相互作用の弱い糖鎖認識抗体（例えばIgMクラスに分類される糖鎖認識抗体など）もそれに該当する。

40

#### 【 0 0 2 6 】

本発明における基板としては、導光性を有し、本発明の解析装置の光照射手段により、

50

その表面にエバネッセント波を発生できるものであればよく、ガラス、石英ガラス、合成石英ガラスなどが例示できるが、これらに限定されるものではない。また、本発明におけるレクチンが固定化された基板は、好ましくは、エポキシ基を活性基として有する化合物であるがこれに限定されるものではなく、ビニルスルホン基、活性エステル基、アルデヒド基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、イソチオシアネート基等がコートされた基板上にレクチン等の糖鎖結合性タンパク質が固定化された基板である。

#### 【0027】

エポキシ基を活性基として有する化合物としては、好ましくは3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GTMS) が挙げられるが、これに限定されない。その他に、2-(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、3-グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、又は分岐したスペーサーの先端にエポキシ基を複数持つシランカップリング化合物で、好ましくはスペーサーとしてポリエチレングリコールやタンパク質、ピオチン・アビジン等を含む化合物などが例示できる。

10

#### 【0028】

本発明の糖鎖あるいは複合糖質の解析に用いる基板は、レクチン等の糖鎖結合性タンパク質がその表面に複数種配置固定化された基板であり、例えば、下記の方法で作製できる。

以下に糖鎖結合性タンパク質としてレクチンを使用する場合を例にして説明する。

20

#### 【0029】

まず、基板にエポキシ基を活性基として有する化合物をコートする。例えば、エポキシ基を活性基として有する化合物としてGTMSを用いる場合、後記する実施例に記載の方法で行うことができる。具体的には、スライドガラスを10% KOH / MeOH溶液に浸し、容器ごと振盪させた状態で1時間放置しガラス表面を処理し、これを十分量の精製水 (ミリQ水) により洗浄した後、60 °Cのオープン内で乾燥させる。次にスライドガラスを2% GTMS アセトン溶液に浸し、遮光下で容器ごと振盪させながら1時間反応させる。GTMSのアルコキシシリル基は水で加水分解されてシラノール基となっており、このシラノール基は不安定で、経時変化により部分的に結合してオリゴマー状態になり、続いてガラス表面に水素結合的に吸着する。反応後、スライドガラスを110 °Cのオープン内で8時間乾燥させる。乾燥処理により、ガラス表面のシラノール基と脱水縮合反応が起こり、強力な共有結合となる。一連のGTMSコーティング方法を図1に示す。

30

#### 【0030】

次に、エポキシ基を活性基として有する化合物をコーティングした基板に、レクチンをスポットし、該レクチンのアミノ基を利用して反応させることで固定化することができる。本発明においては、同一基板上に複数種のレクチンをスポットする。

また、この際、複数種のレクチンは、その種類に応じて所定のパターンでスポットすることにより配置固定することが望ましい。これにより、試料の糖鎖あるいは複合糖質間の、あるいは既知の糖鎖あるいは複合糖質との異同判定、近似性判定が容易に行える。

アレイの作製においては、市販のDNAマイクロアレイ作製用ピントタイプスポッターや非接触式インクジェットスポッターが利用できる。レクチンのスポット後はTween20を含むPBS溶液 (PBST) で洗浄することにより、未結合レクチンを除去することができる。

40

#### 【0031】

上記レクチンが固定化された基板は、複数の反応槽を形成させた基板であることが好ましい (図2参照)。より好ましくは、複数の穴を有するラバーを貼り付けることで、複数の反応槽を形成させた基板である。一例としては、実施例に記載のように、糖鎖に相互作用を示すタンパク質を固定化したスライドガラスに対し、本発明者らが設計・開発した8穴ラバーを所定の位置に貼り付け、8つの反応槽を作製させる。この8穴ラバーには8つの長方形の穴が規則正しく空いており、専用のアジャスター上でスライドガラスと密着させることによってスポット周囲に正確に蛍光標識化糖プローブ溶液を満たすことが可能と

50

なる。この反応槽に蛍光標識化プローブ溶液を満たすことで、糖鎖に相互作用を示すタンパク質との接触を円滑に行うことが可能になる。また反応槽は多数化することが好ましく、より好ましくは12, 16の反応槽を市販の96, 384ウェルプレートの規格と同じ間隔をおいて配置することが好ましい。また、この反応槽を形成する素材はシリコンラバーに限定されるものではなく、例えばガラス表面の非スポット領域を撥水コートすることで反応場を形成することも可能である。

一方、本発明の基板においては、同一種のレクチンを複数配置固定化することが望ましい。これにより同一種のレクチンに対する被験糖鎖あるいは複合糖質の相互作用に基づく蛍光強度の平均値を算出することが可能となり、スポットの大きさ・形状の不良や、基盤の不均一性に由来するレクチンの固定化量の相違、あるいはスポットに結合した標識プローブ分子数、励起光の不均一性や検出素子の電氣的雑音等に由来する、測定したスポットシグナル強度のバラツキ等に起因する測定誤差を軽減できる。

また、本発明の基板においては、糖タンパク質を解析する際に、レクチン等の糖鎖結合タンパク質を複数種配置固定するとともに、さらに糖タンパク質のタンパク質部分に対する抗体を配置固定することができる（ハイブリッドアレイの作製）。この基板によれば、糖タンパク質の糖鎖部分の解析とタンパク質部分の解析を同時に行うことができる。これによれば、タンパク質が異なるが糖鎖が同じもの、あるいは糖鎖が異なるが同じタンパク質であるもの等を簡便に識別できる。

#### 【0032】

図3は本発明の解析装置の一例を示す図である。

この装置は、レクチン等の糖鎖結合性タンパク質を複数種配置固定した導光性材料からなる基板(1)と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて蛍光標識を励起する手段(2)、(2')と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段(3)とを有し、基板(1)は、基板載置手段(4)上に着脱自在に載置され、基板載置手段は、基板上に生じた蛍光を遮蔽することなく、蛍光強度測定手段に導くため、枠体からなることが好ましい。上記蛍光標識励起手段(2)、(2')は基板端面に面して設けられる。エバネッセント波は、物質境界面で光が全反射するとき発生するが、この全反射させるための入射角は、物質・材料によって異なる。本発明においては種々の材料基板に対応するよう入射角度を調製するため、上記蛍光標識励起手段(2)、(2')は、基板側部端面に対する光導入角度を調節可能に設ける。

また、蛍光標識励起手段は、基板上に配置固定される糖鎖結合性タンパク質の列が少ない場合、例えば1列の場合には該列に直交する基板端面側の片方にのみ設ければよいが、糖鎖結合性タンパク質の列が多数の場合は、例えば基板両側に設けて、基板表面に均一なエバネッセント波を発生することが好ましい。蛍光標識励起手段(2)、(2')が基板端面に導入する光の種類は、例えばレーザーやLD、LEDより得られるパルス・又は連続した単色光、又はメタルハライドランプ、キセノンランプ等により得られるそのままの白色光や、これを光学フィルターにより任意の波長範囲に切り出した光を用いることができる。

蛍光強度測定手段(3)としては、特に制限はなく、電荷結合素子(CCD)カメラ、イメージンテンシファイアー付電荷結合素子(ICCD)カメラ、冷却CCDカメラ、光電子増倍管(PMT)を使用することもできる。

#### 【0033】

エバネッセント波の励起により基板(1)上に生じた蛍光の強度を測定する場合、蛍光強度測定手段(3)上において、基板載置手段(4)を移動させて糖鎖結合性タンパク質固定化基板全面を例えばXY方向に動かしてスキャンするが、この場合基板(1)を固定し蛍光強度測定手段(3)を移動してスキャンしてもよい。

以下に、本発明の上記解析装置を用いて、被験糖鎖あるいは被験複合糖質を解析する場

合について具体的に説明する。

【0034】

本発明においては、まず、上記複数種のレクチン等の糖鎖結合性タンパク質を配置固定した基板(1)を基板載置手段(4)に載置し、該基板(1)上に、蛍光標識した被験糖鎖または被験複合糖質含有試料を導入し、基板(1)上の各糖鎖結合性タンパク質と蛍光標識した被験糖鎖または被験複合糖質を接触させる。

【0035】

本発明において、被験糖鎖または被験複合糖質の蛍光標識剤としては、2-アミノピリジン、Cy3、Cy3.5、Cy5、テトラメチルローダミン、フルオレセイン骨格を持つ蛍光色素各種、モレキュラープローブ社製蛍光色素Alexaシリーズ、量子ドット蛍光色素が挙げられるが、糖鎖を蛍光標識する性質を有する物質であれば、これらに限定されない。

10

【0036】

被験糖鎖又は被験複合糖質は、直接的又は間接的に蛍光標識することができる。被験糖鎖と、予め蛍光標識した糖鎖結合性タンパク質を結合させることにより、被験糖鎖を間接的に蛍光標識できる。

【0037】

また、予め蛍光標識したタンパク質であって、被験複合糖質の糖鎖以外の部分に結合するタンパク質(例えば被験複合糖質の糖鎖以外の部分に相互作用を示す抗体)と被験複合糖質を結合させることにより、被験複合糖質を間接的に蛍光標識できる。

【0038】

また、予め蛍光標識した糖鎖結合性タンパク質と被験複合糖質を結合させることによっても、被験複合糖質を間接的に蛍光標識できる(この場合、被験複合糖質が有する糖鎖のうち、糖鎖結合性タンパク質が結合した糖鎖以外の糖鎖が基板に結合する)。

20

【0039】

例えば、標的複合糖質の糖鎖以外の部分に相互作用を示す予め蛍光標識した抗体を、標的複合糖質試料を含むサンプル・血液・体液・生体抽出成分・食品成分等のクルードな試料に作用させることで、クルードな試料から標的複合糖質を分離・精製することなく選択的に蛍光標識できる。また、予め蛍光標識した上記抗体を作用させたクルードな試料を、例えばレクチン等の糖鎖結合性タンパク質が固定化された基板に接触させることで、標的複合糖質の糖鎖情報だけを選択的に観察できる。

30

【0040】

本発明の装置を使用する場合においては、次いで、基板(1)を洗浄せずに、蛍光標識励起手段(2)、(2')から該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて、被験糖鎖あるいは複合糖質の蛍光標識基を励起する。

【0041】

エバネッセント励起方式では励起光をガラス内部で全反射させた際に界面から200~300nm(励起波長の半分程度)の範囲に、エバネッセント光と呼ばれる微弱光がしみ出すことが知られている。蛍光物質で標識した糖鎖あるいは複合糖質を含む溶液をスライドガラス上に接触させた状態でこのエバネッセント光を利用して蛍光標識基を励起すると、ブラウン運動をしている蛍光標識分子すなわち結合反応に預からない分子をほとんど励起することなく、結合反応に預かる界面近傍のプローブ分子を選択的に観察することができる。

40

例えば、基板に固定されたレクチンあるいはIgMクラス等の糖鎖認識抗体と被験糖鎖又は被験複合糖質の相互作用は、一般的に良く知られているタンパク質間相互作用などに比べて弱いため、プローブ溶液の除去・洗浄操作を行うことで、これらの糖鎖結合性タンパク質と被験糖鎖または被験複合糖質間の解離反応が進行してしまい、平衡状態下での正確な相互作用情報を得ることが出来ないケースが生じていた。

【0042】

本発明者らは上記問題を、プローブ溶液の洗浄を行うことなく、エバネッセント波により蛍光標識基を励起させ、蛍光の強度を測定することで解決したものである。また洗浄工

50

程を経ずにスキャンできるため、一定時間ごとに連続的にスキャンを実行することで、プローブ添加直後から相互作用の経時変化を追跡することが可能となり、同一ガラス上に固定化されている各糖鎖結合性タンパク質とプローブ間の相互作用反応がそれぞれ平衡状態に達しているか否かを容易に判断することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

上記エバネッセント波による励起により生じた蛍光は、蛍光強度測定手段(3)により、基板上的各糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎にその蛍光強度が測定される(複数種のレクチンを基板に配置固定した場合、各レクチンの配置位置、すなわちレクチンの種類毎に蛍光強度が測定される)。例えば、被験糖鎖の各レクチンに対する蛍光強度と、同様に測定した既知の糖鎖の各レクチンに対する蛍光強度を対比すれば、その異同、類似性、非類似性等を判定できる。

10

この場合、例えば蛍光強度手段としてICCDカメラ上で基板をスキャンし、各レクチンに対する蛍光強度を画像として表示すれば、対比がさらに容易になる。

本発明は、糖鎖構造解析を迅速・簡便に行う糖鎖プロファイラーとしての有用な手段である。これには、例えば、蛋白質核酸酵素2003年8月号増刊Vol. 48, NO. 11に記載のプロファイリング手法が応用可能である。

#### 【 0 0 4 4 】

すなわち、本発明の装置における上記蛍光強度の測定値は、コンピューターによる情報処理を行うことにより、糖鎖構造分析に用いられる。したがって、本発明の装置にはこのようなコンピューターによる情報処理システムを包含する。このような情報処理を行うことにより、被験糖鎖が既知構造を有している場合は被験糖鎖の構造を同定することができ、被験糖鎖が未知構造を有している場合であっても被験糖鎖中に存在する特徴的な構造(2-3シアル酸・2-6シアル酸・1-3ガラクトース・1-3フコース・1-6フコース・バイセクトN-アセチルグルコサミン・硫酸化など)の予測、ないし既知構造糖鎖との類似性を指摘することができる。

20

この手段は、蛍光標識した被験糖鎖を接触させた、糖鎖あるいは被験糖鎖に相互作用を示す複数種の糖鎖結合性タンパク質、例えば複数種のレクチンがそれぞれ配置固定化された基板を装置にセットすると、自動的に、糖鎖構造が表示されるシステムである。

このようなシステムを有する装置においては、糖鎖に相互作用を示す種々のタンパク質がそれぞれ固定化された基板に蛍光標識した被験糖鎖を接触させる工程を自動化することもできる。すなわち、微小流路系を基板上の反応槽に導き、流路内に送液する溶液の種類・濃度・流速をコントロールすることで、ブロッキングやブロッキング液の洗浄除去工程、蛍光標識糖鎖溶液の接触工程を一元的にコントロールすることができる。これらの方法を用いることで、さらに信頼度の高いデータを得ることができるため、大変に有用である。

30

また本発明の装置による被験糖鎖の部分糖鎖構造を推定する場合、糖質加水分解酵素による酵素消化を併用することで、より信頼度の高いデータを得ることができる。例えば、被験糖鎖の非還元末端部分糖鎖構造にシアル酸が含まれているかどうか、さらに含まれている場合その結合位は2-3および2-6のいずれであるかを判定する場合、被験糖鎖を特異性の高いシアリダーゼ(例えば*Macrobdella decora*由来2-3-ノイラミニダーゼは2-3シアル酸のみを切断し、*Arthrobacter ureafaciens*由来シアリダーゼAは2-3シアル酸よりも2-6シアル酸を好んで切断する)で消化し、反応前後のプロファイルの変化の有無を調べることで、容易に行うことができる。さらに多種の糖質加水分解酵素を逐次反応させることで、より広範囲な部分糖鎖構造を推定することが可能になる。ガラス上に8つの反応槽を作製することで、8通りの酵素消化反応物を同時にプロファイルすることが可能になり、糖鎖構造推定がより容易になる。

40

酵素消化による部分糖鎖構造推定に用いることのできる糖質加水分解酵素は、ほかにJack Bean由来-ガラクトシダーゼ、Green Coffee Bean由来(1-3,4,6)-ガラクトシダーゼ、*Streptococcus pneumoniae*由来-N-アセチルヘキソサミニダーゼ、トリ肝臓由来-

50

N-アセチルガラクトサミニダーゼ、Jack Bean由来 (1-2,3,6)マンノシダーゼ、Helix pomatia由来 マンノシダーゼ、ウシ腎臓由来 -フコシダーゼ、Corynebacterium sp.由来 1,2-L-フコシダーゼ、Xanthomonas sp.由来 1,2-キシロシダーゼ、およびそれらすべての組換え体などが挙げられる。

また被験糖タンパク質中のN結合型およびO結合型糖鎖の存在およびその構造推定を行う場合、エンド型糖質加水分解酵素を併用すると、より構造推定のデータの信用度が高くなる。この際に使用できるエンド型糖質加水分解酵素は、Streptomyces plicatus由来エンドグリコシダーゼH、Flavobacterium meningosepticum由来PNGase F、Streptococcus pneumoniae由来O-グリカナーゼ、Chryseobacterium meningosepticum由来エンドグリコシダーゼF1、およびそれら全ての組換え体などが挙げられる。

10

#### 【0045】

図4に本発明の情報処理システムの一例を示す。

該システムは、以下の(a)~(c)の手段を少なくとも含む。

(a) 構造既知の各糖鎖あるいは複合糖質について、本発明の上記解析装置を用いて測定された、糖鎖結合性タンパク質、例えば、レクチンの配置位置毎(レクチンの種類毎)に蛍光強度データを強、中、弱等の3段階あるいは6段階等に段階分けして、各糖鎖結合性タンパク質に対する相互作用をパターン化して記憶した記憶手段(データベース)。

(b) 被験糖鎖あるいは被験複合糖質に対して本発明の上記解析装置を用いて測定された、基板上の各糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎の蛍光強度測定データと、(a)の記憶手段に記憶されているデータと照合し、測定データあるいは上記パターンが一致あるいは類似する構造既知の糖鎖あるいは複合糖質を1つないし複数選定する演算手段を含むコンピューター

20

(c) 選定結果を表示する表示手段

なお、以下の記載においては、上記測定データあるいは上記パターン化した情報を合わせて蛍光強度情報という場合がある。

#### 【0046】

このシステムにおけるデータベースについては、図5のようにコンピューターの外部にある場合、図6のようにコンピューター内部にある場合、共に許容される。また、該データベースを利用することで、蛍光強度を測定した糖鎖結合性タンパク質の種類が限定された数であっても、多種類の糖鎖を識別することが可能である。例えば、測定したシグナル強度を6段階に分けて認識する場合、十分に性質の異なる10種類のレクチンを利用すれば、理論的には識別可能な糖鎖の種類は $6^{10} = 60,466,176$ となり、事実上自然界に存在する殆どの糖鎖構造の識別が可能である。

30

#### 【0047】

図7に、本発明のシステムにおけるコンピューター構成図の一例を示す。入力手段1と出力手段2がバス線3に接続されている。一時記憶手段4は、入力された情報、および算出された情報などを一時的に記憶する。中央処理装置(CPU)5は、本発明のプログラムの命令を受けて各種演算を行う。記憶手段(データベース)7には、既知の糖鎖あるいは複合糖質についての各糖鎖結合性タンパク質の蛍光強度データあるいは上記と同様なパターン化情報が記憶されている。

40

このほか、他の実験系によって得られた、糖鎖あるいは複合糖質と糖鎖結合性タンパク質との結合性に関する情報を記憶してもよい。

#### 【0048】

記憶手段6には、本発明の処理を実行するためのプログラムを含む各種プログラムが格納されている。本発明の処理を実行するためのプログラムには、入力された糖鎖あるいは複合糖質についての各糖鎖結合性タンパク質の蛍光強度データあるいはそのパターン化情報を、データベースに記憶されている既知の糖鎖あるいは複合糖質についての同様な蛍光強度情報あるいはそのパターン化情報と照合し、データないしパターンが一致あるいは類

50

似する構造既知糖鎖（データベースに格納されている構造既知糖鎖情報）を1つないし複数選出するプログラム61、表示プログラム62、およびこれらを制御するためのプログラム63が少なくとも含まれる。

**【0049】**

上記したことから明らかなように、既知糖鎖あるいは複合糖質との蛍光強度データとそのパターン化情報の照合過程においては、データの値同士を比較してもよい。プログラム61には、例えば、入力された蛍光強度データの値とデータベースに記憶されている既知糖鎖あるいは複合糖鎖情報の値を比較して、その値の近さから構造既知糖鎖を1つないし複数選出する機能が組み込まれていてもよい。

10

**【0050】**

プログラム62（図8）は、例えば、被験糖質あるいは複合糖質について得られた各スポットの平均蛍光強度データや、シグナルノイズ比（S/N比）とそのばらつき・標準偏差、該蛍光強度から算出した正味輝度値とこれをパターン化したパターン化情報（図9）、選出された構造既知糖鎖情報の表示などを行う。このパターン化に際しては、適切な内部標準を用いて相互作用情報の規格化を行うことも可能である。

本発明においては、上述のプログラムを1つのプログラムにまとめることもできる。

**【0051】**

本発明の解析装置においては、レクチン固定基板（1）を、複数枚解析装置にセットして、自動的に順次、蛍光強度測定部に移行させ、蛍光標識励起手段（3）を作動させて、スキャンし、得られた蛍光強度データを自動的にコンピューターに入力するようにしてもよい。入力されたデータは、コンピューターの記憶手段又は一時記憶手段に記憶しておくことができる。また、蛍光強度データあるいはこれをパターン化したパターン化情報は、被験糖鎖あるいは複合糖質の由来等の情報とともにデータベースに記憶するのが好ましい。さらに糖鎖構造が判明次第順次構造情報も蓄積することにより、今まで存在しえなかった大規模かつ実用性の高い、糖鎖あるいは複合糖質と各種糖鎖結合タンパク質の結合状態に基づく糖鎖構造解析のための情報データベースを構築することができる。

20

30

**【0052】**

本発明によれば、中央処理装置（CPU）などの演算手段が記憶手段中に格納されたプログラム62の指令を受け、記憶手段又は一時記憶手段に記憶された蛍光強度情報を読み出し、該蛍光強度情報を表示することもできるが、例えば、あらかじめ性状を十分に調査した基準となる糖鎖に相互作用を示す特定の糖鎖結合性タンパク質試料スポット（内部標準スポット）の発する蛍光強度を基準として、各スポットの輝度値を補正した値を表示することができる。内部標準スポットは複数であってもよい。

**【0053】**

処理のフローの一例としては、次いで、入力された蛍光強度情報を、データベースに記憶されている各糖鎖結合性タンパク質に対する各種糖鎖の蛍光強度情報と照合し、パターンが一致する構造既知糖鎖を1つないし複数選出する。この処理工程は、中央処理装置（CPU）などの演算手段が記憶手段中のプログラム61の指令を受け、記憶手段又は一時記憶手段に記憶された蛍光強度情報とデータベースに格納されている既知糖鎖あるいは複合糖質についての蛍光強度情報を照合し、情報のパターンが一致ないし近似する構造既知糖鎖を1つないし複数選出する。選出された構造既知糖鎖情報は、コンピューターの記憶手段又は一時記憶手段に格納しておくことができる。

40

**【0054】**

データベースがコンピューターの外部にある場合は、中央処理装置（CPU）などの演算手段が記憶手段中のプログラム61の指令を受け、データベースに記憶されている既知糖鎖あるいは複合糖質についての蛍光強度情報をコンピューターに入力し、コンピューター

50

一の記憶手段又は一時記憶手段に記憶された蛍光強度情報を読み出し、それぞれの蛍光強度情報を照合し、情報のパターンが一致する構造既知糖鎖を1つないし複数選出する。

【0055】

処理のフローの一例としては、次いで、選出結果が表示手段によって表示される。この処理工程では、中央処理装置（CPU）などの演算手段が記憶手段中のプログラム62の指令を受け、記憶手段又は一時記憶手段に格納された構造既知糖鎖情報を読み出し、表示する。

【0056】

本発明は、異なる複合糖質の混合物中から、目的としたタンパク質の糖鎖修飾の状況を迅速かつ簡便に調べる方法として有用であり、血液・体液・生体抽出成分・食品成分等の原液又は希釈溶液等の様々な成分の混合溶液を精製することなく、目的タンパク質の糖鎖修飾の状況を観察することで、診断・治療状況の把握等を行うような分野での応用が考えられる。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

以下に本発明の実施例を示す。該実施例は、図3に示す本発明の解析装置を使用して、実際に糖鎖を解析したものである。なお、解析装置の外観は図10の装置写真に示される。

【実施例】

【0057】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕レクチンアレイを利用した糖鎖とレクチンとの相互作用解析

(1) 蛍光標識化糖タンパク質プローブ（Cy3-ASF）の調製

蛍光標識化糖タンパク質プローブとして、アシアロフェツイン（SIGMA社、以下ASF）を550 nm付近に吸収極大波長を持つ蛍光色素であるCy3 Mono-reactive Dye（アマシャムファルマシア社、以下Cy3）を用いて蛍光標識化して調製した。ASFはN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖を3本ずつ分子中に持ち、かつ糖鎖中の非還元末端のシアル酸キャップが部分的に外れている糖鎖構造を持つことが知られている。ASFを0.1 M 炭酸緩衝液（pH 9.3）に終濃度1 mg/mLになるよう調製した後、1 mLについて1.0 mgのCy3粉末と混合させ、1時間、適時攪拌しながら暗所で反応させた。

【0058】

次に担体としてSephadex G-25を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、遊離のCy3とCy3-ASFを分離回収し、精製したCy3-ASFについて吸光度計を用いて濃度及び蛍光標識効率を測定した。タンパク質ベースの収率は35-40%、蛍光標識効率（1タンパク質分子あたりの蛍光色素数）は約3.0であった。

【0059】

(2) スライドガラスへのGTMSコーティング

エポキシ基を活性基として有する3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン（信越シリコン社、以降GTMS）をコーティングしたスライドガラス（図1）を用い、レクチンをガラス表面に固定化した。GTMSコーティングは、松浪硝子工業社製のスライドガラスを用い、以下の手順で行った。スライドガラスを10% KOH / MeOH溶液に浸し、容器ごと振盪させた状態で1時間放置しガラス表面を処理した。これを十分量の精製水（ミリQ水）により洗浄した後、60 °Cのオープン内で乾燥させた。次にスライドガラスを2% GTMS アセトン溶液に浸し、遮光下で容器ごと振盪させながら1時間反応させた。反応後、110 °Cのオープン内で8時間乾燥させた後、十分量の精製水により洗浄し、乾燥させた。

【0060】

(3) スライドガラスへのレクチンの固定化

(2)のGTMSコーティングを施したスライドガラスにレクチンをスポットした。マイクロアレイスポッターとして日本レーザ電子社製STAMPANを使用し、先端直径0.40 mmのス

10

20

30

40

50

タンブピンを使用してスポットを行くことで、直径約0.6 - 0.7 mm のスポットをスライドガラス上に配置した。スポットする各レクチンを濃度1 mg/mL (レクチンによっては一部0.25 mg/mL) となるようにリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4 (以下PBS) に溶解した。これを96 穴のPCR用マイクロタイタープレート (コーニング社) の各反応槽に10  $\mu$ Lずつ分注したものを、マイクロアレイスポッターにセットした。

#### 【0061】

スライドガラスへのレクチンの固定化操作に際しては、以下の条件をマイクロアレイスポッター付属のコンピューターに記憶させ、スタンブピン動作プログラムを実行させた。まずスタンブピンを96 穴PCR用マイクロタイタープレート内の固定化試料溶液中に1秒間浸した後に引き上げ、スライドガラス表面の所定の位置に1秒間接触させた。この動作を10  
1 スポットごとに繰り返しながら、同一試料溶液から横1列に4点スポットを行った後、スタンブピンの洗浄工程を行った。洗浄工程ではスタンブピンの針先を0.05% SDS溶液に2秒間浸し、スタンブピンをバキューム装置内で15秒間乾燥させ、さらに精製水に2秒間浸した後に、バキューム装置内で15秒間乾燥、最後にエタノールに2秒間浸してからバキューム装置内で15秒間の乾燥操作を行った。

#### 【0062】

本実施例では様々な糖結合特異性をもったレクチン4種 (RCA120、SSA、組み換え放線菌由来キシラーゼのキシラン結合ドメイン (以下XBD)、組み換えミミズ29 kDaレクチン由来のC末端側ドメイン (以下EW29 (Ch)) と、ネガティブコントロール1種 (ウシ血清アルブミン (以下BSA)) の計5種のタンパク質をスポットした。RCA120、BSAについてはSIGMAより購入したもの、SSAは生化学工業より購入したもの、XBD、EW29 (Ch) については本発明者らの研究室で大腸菌にて発現・精製したものをを用いた。20

#### 【0063】

##### (4) 非スポット面のブロッキング

レクチン溶液をスポット処理後1時間反応させガラス表面に固定化した後、未結合レクチンを洗浄した。洗浄は0.1% Tween20を含むPBS溶液 (PBST) を数回ピペットでスライドガラスに吹き付けるようにかけて洗浄した後、PBSを用いてさらに十分に洗浄した。

#### 【0064】

このレクチン固定化後のスライドガラスに対し、本発明者らが設計・開発した8穴ラバーを所定の位置に貼り付け、8つの反応槽を作製した (図11)。この8穴ラバーは厚さ1 mmからなる黒色のシリコンゴム製で、縦横9.5  $\times$  7.5 mmからなる8つの長方形の穴が規則正しく空いており、スライドガラスに貼り付けたときに8つの反応槽を形成することができる。この反応槽に50  $\mu$ L程度の試料を加えれば、内部を十分量の試料溶液で満たすことができる。30

#### 【0065】

レクチンをスポットした領域以外のガラス表面には活性基であるエポキシ基が残存しているため、非スポット面に対するブロッキング操作を行った。なお、ブロッキング剤には高純度BSA (SIGMA) を使用した。8つの反応槽内に1% BSAを含むPBS溶液を50  $\mu$ Lずつ満たし、湿度を90%以上に保った保存容器中で4、1時間放置し、スライドガラス上の非スポット面へのブロッキングを行った。反応の間はガラス表面の乾燥防止に留意した。40

#### 【0066】

次にスライドガラス上のブロッキング溶液を除去し、PBSを用いて十分に洗浄した後、水分を除去した。タンパク質固定化後はガラス表面の乾燥によるタンパク質の変性や、乾燥に伴うバックグラウンドの上昇を防ぐため、可及的速やかに次の操作に移った。

#### 【0067】

##### (5) プローブ溶液の添加とスキャン

(4) で作製したレクチン固定化スライドガラス上の反応槽に、相互作用を解析したい蛍光標識化糖タンパク質プローブ溶液を加えた。蛍光標識化糖タンパク質プローブは終濃度10  $\mu$ g/mLになるようPBSに溶解したものを調製し、それぞれの反応槽に50  $\mu$ Lを滴下した。50

## 【 0 0 6 8 】

レクチン-糖鎖間の反応が平衡に達するまで静置した後に、エバネッセント励起方式マイクロアレイスキャナーであるGTMAS Scan III（日本レーザー電子社）を使用してスライドガラス端面より励起光を入射し、励起されて生じた蛍光発光を、スライドガラス下面に配置されているICCDカメラで検出した。スライドガラスのほぼ全面に対する蛍光イメージをスキャンし、得られたイメージ画像をTIFFファイル形式（1枚につき約100 MB）にて保存した。スキャン時のパラメーターはGain「5000倍」、積算回数「4回」、露光時間「33 msec」で統一した。

## 【 0 0 6 9 】

## ( 6 ) スキャン画像の数値化

スキャン画像の数値化には市販のマイクロアレイ用解析ソフトであるArray-Pro Analyzer（version 4.0 for Windows（登録商標）、Media Cybernetics社）を使用した。各スポットの輝度を、上記解析ソフトを用いて算出し、非スポット領域の輝度をバックグラウンド値とした。各スポットの輝度からバックグラウンド値を差し引いたものを正味の輝度値とし、横列に4点並べた同一試料由来のスポットごとに平均値と標準偏差を算出した。

## 【 0 0 7 0 】

以降各レクチン試料に対するプローブの結合に対しては、この同一試料由来の4点の平均輝度値を用いて評価を行った。以降に示す各レクチンアレイの性能評価は操作（2）～（6）の一連の工程を経た後に行われた。

## 【 0 0 7 1 】

## ( 7 ) GTMSコートスライドガラスの性能評価

上述のように作製したGTMSコートスライドガラスの性能を、既存のスライドガラス（6種）と比較評価した。すなわち表面コートされた各スライドガラスに、あらかじめCy3標識したレクチン（100 µg/mL）をアレイ状に固定化し、（3）～（6）の工程を経た後に、スポット領域の輝度値（S）と非スポット領域の輝度値（N）からS/N比を算出した。その結果、表1に示すように（2）の行程で作製したGTMSコートスライドガラスの輝度値は、最高値を示したスライドガラスAの2分の1程度にとどまったが、バックグラウンドが非常に低いため、そのS/Nは16.1となり、今回評価したスライドガラスの中で最良値を示した。

## 【 0 0 7 2 】

## 【表1】

## 各スライドガラスの性能評価

100 µg/ml Cy3 RCA-120 in 30% glycerol/PBS

	スポット4点の平均値 (Gain × 1000) <sup>注</sup>	ブランク4点の平均値 (Gain × 1000)	S/N 比
市販スライドガラスA	60617	5971	10.2
市販スライドガラスB	52059	4013	13.0
市販スライドガラスC	36462	2865	12.7
<b>GTMSスライドガラス</b>	<b>28220</b>	<b>1753</b>	<b>16.1</b>
市販スライドガラスD	13838	4520	3.1
市販スライドガラスE	12802	3105	4.1
市販スライドガラスF	5902	1621	3.6

注)同一 Cy3 標識レクチンスポットの平均輝度値を比較

## 【 0 0 7 3 】

## ( 8 ) アレイ上の固定化レクチン濃度の検討（図12および13）

RCA120とConAはそれぞれ複合型糖鎖と高マンノース型糖鎖に対し高い親和性をもつこと

が知られる代表的なレクチンである。これらのレクチンを様々な濃度で調製し、同一試料について横に4点並べてアレイ状にスポットした。このアレイの各反応槽に対して10 µg/mLのCy3-ASFを各50 µLずつアプラインして結合反応を起こさせた後に、スキャナーで蛍光を観察した。

#### 【0074】

上述したようにASFはN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖を3本ずつ分子中に持ち、かつ糖鎖中の非還元末端のシアル酸キャップが外れラクトサミン構造が突出した糖鎖構造を持つことが知られている。よってRCA120とConAを固定化したレクチンアレイに対し、Cy3-ASFを添加した実験系においては、RCA120が非常に強い親和性を示し、ConAが弱い親和性を示すことが予想された。

10

#### 【0075】

実験の結果、RCA120のスポットが強い蛍光を発したのに対し、ConAのスポットは同条件のRCA120のスポットに比べて1/3程度の蛍光強度を示すに止まった。ConAが弱いながらも複合型糖鎖を持つASFに結合したのは、N-結合型糖鎖のうちASFに主として存在する3本鎖型糖鎖には結合できないものの、少量存在するとされる2本鎖型糖鎖には結合できると考えられた。またこのデータから、同一試料由来の4点についての標準偏差(SD)は約±20%程度になるということが分かった(図13)。

#### 【0076】

次にスポット時のレクチン濃度と蛍光強度の関係をグラフ化したところ、スポット時のレクチン濃度と蛍光強度の間に正の相関関係があり、スポットするレクチン試料の濃度を1 mg/mL以上に高濃度化することで、効果的にシグナル強度を向上することができることが分かった。すなわち親和定数の小さい(結合の弱い)レクチン-糖鎖間の相互作用の検出は固定化レクチン濃度を上げる事により可能となることが分かった(図13)。

20

#### 【0077】

##### (9) レクチンアレイの性能評価

様々な糖特異性をもったレクチン4種(RCA120、SSA、XBD、EW29(Ch))、とネガティブコントロール1種(BSA)の計5種のタンパク質を同一試料について横に4点並べてアレイ状にスポットした。このアレイについて10 µg/mLのCy3-ASFを各50 µLずつ滴下し、スキャナーで蛍光を観察した。

#### 【0078】

実験の結果、フロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)でラクトサミン構造に親和性があると確認することができたRCA120、EW29(Ch)の2種のレクチンのスポットにおいて、蛍光シグナルが観察された(図14)。またそれぞれの蛍光強度を比較すると、RCA120のスポットにおいて強い蛍光が、EW29(Ch)のスポットにおいては中程度の蛍光が観察され、FAC解析データと一致した。

30

#### 【0079】

また同条件のアレイに対しラクトース(競合阻害糖)共存下で同様の実験を行ったところ、阻害糖の濃度上昇に伴って、スポットの蛍光強度の減少が観察された(図15)。このことから、蛍光糖タンパク質プローブとの結合はレクチンと糖鎖間の糖特異的結合反応によるものであることを確認することが出来た。

40

#### 【0080】

〔実施例2〕 レクチン-抗体を同一区画内にスポットしたハイブリッドアレイによる解析(図16)

##### 1. 材料と方法

##### (1) モデル糖タンパク質の蛍光標識化プローブの調製

本実験例ではレクチンアレイ上に固定化するレクチンとして、様々な糖結合特異性を持つレクチンとして6種(RCA120、ECA、ConA、GNA、SSA、SNA)を選択した。またネガティブコントロールとして糖鎖と結合しないタンパク質であるBSAを選択した。また今回の実験では、プローブのコアタンパク部分を認識する抗フェツイン抗体と抗RNase抗体の2種を

50

、レクチンと同じ区画内にスポットした。GNA、SNAはVECTOR社より購入したもの、BSAについてはSIGMA社より購入したもの、RCA120、ECA、ConA、SSAは生化学工業より購入したものをを用いた。

#### 【0081】

モデル蛍光標識化糖タンパク質プローブは、ASF、FET、ウシ臍由来リボヌクレアーゼ B (RNase B)、またネガティブコントロールとしてウシ臍由来リボヌクレアーゼA (RNase A)、BSAなどのタンパク質 (全てSIGMA社より購入) を550 nm付近に吸収極大波長を持つ蛍光色素であるCy3 Mono-reactive Dye (アマシャムファルマシア社、以下Cy3) を用いて蛍光標識化することで調製した。プローブ作製時は前述のタンパク質を0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.3) に終濃度1 mg/mLになるよう調製した後、1.0 mgのCy3粉末と混合させ、1時間

10

#### 【0082】

##### (2) スライドガラスへのGTMSコーティング

エポキシ基を活性基として有する3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (信越シリコン社、以降GTMS) をコーティングしたスライドガラス (図1) を用い、レクチンをガラス表面に固定化した。GTMSコーティングは、松浪硝子工業社製のスライドガラスを用い、以下の手順で行った。スライドガラスを10% KOH / MeOH溶液に浸し、容器ごと振盪させた状態で1時間放置しガラス表面を処理した。これを十分量の精製水 (ミリQ水) により洗浄した後、60 °Cのオーブン内で乾燥させた。次にスライドガラスを2% GTMS アセトン溶液に浸し、遮光下で容器ごと振盪させながら1時間反応させた。反応後、110 °Cのオーブン内で8時間乾燥させた後、十分量の精製水により洗浄し、乾燥させた。

20

#### 【0083】

##### (3) レクチンアレイの作製

(2) で作製したGTMSコートスライドガラスに対してレクチンをスポットし、レクチンアレイを作製した。マイクロアレイスポッターとして日本レーザ電子社製STAMPMANを使用し、先端直径0.40 mmのスタンプピンを用い、直径約0.5 mm のスポットをスライドガラス上に配置した。スライドガラスへのレクチンの固定化操作に際しては、以下の条件をマイクロアレイスポッター付属のコンピューターに記憶させ、スタンプピン動作プログラムを実行させた。まずスタンプピンを96 穴PCR用マイクロタイタープレート内の固定化試料溶液中に1秒間浸した後に引き上げ、スライドガラス表面の所定の位置に1秒間接触させた。この動作を1スポットごとに繰り返しながら、同一試料溶液から横1列に6点スポットを行った後、スタンプピンの洗浄を行った。洗浄工程ではスタンプピンの針先を0.05% SDS溶液に2秒間浸し、スタンプピンをバキューム装置内で15秒間乾燥させ、さらに精製水に2秒間浸した後に、バキューム装置内で15秒間乾燥、最後にエタノールに2秒間浸してからバキューム装置内で15秒間の乾燥操作を行った。

30

#### 【0084】

##### (4) 非スポット面のブロッキング

上記の操作でレクチンをスポットしたスライド上に、シリコンゴム製の8穴ラバーを接着して8つの反応槽を作製した。この反応槽に0.1% Tween20を含むPBS溶液 (PBST) を満たすことで、スライド固層に結合しなかった余剰レクチンを洗浄・除去した。次に1% BSAを溶解したPBS溶液を各反応槽に200  $\mu$ Lずつ満たした後に、湿度を90%以上に保った保存容器中で4 時間放置することで非レクチンスポット領域のブロッキング操作を行った。

40

#### 【0085】

##### (5) プローブ溶液の添加とスキャン

ブロッキングを終えたスライドに対し、約100 ng/mLに調整した各蛍光標識化糖タンパク質プローブ溶液を各反応槽に50  $\mu$ Lずつ加えることで、アレイ上にプローブ溶液を接触させた。

#### 【0086】

レクチン-糖鎖間の反応が平衡に達するまで静置した後に、エバネッセント励起方式マ

50

マイクロアレイスキャナーであるGTMAS Scan III (日本レーザー電子社) を使用してスライドガラス端面より励起光を入射し、励起されて生じた蛍光発光を、スライドガラス下面に配置されているICCD (イメージインテンシファイアー付電荷結合素子) カメラで検出した。スライドガラスのほぼ全面に対する蛍光イメージをスキャンした後、得られたイメージ画像をTIFFファイル形式にて保存した。スキャン時の各パラメーターは、Gain「4000倍」、積算回数「8回」、露光時間「110 msec」で統一した。

【0087】

#### (6) スキャン画像の数値化

スキャン画像の数値化には市販のマイクロアレイ用解析ソフトであるArray-Pro Analyzer Ver. 4.5 (Media Cybernetics社) を使用した。各スポットの輝度を上記解析ソフトで算出し、非スポット領域の輝度をバックグラウンド値とした。各スポットの輝度からバックグラウンド値を差し引いたものを正味の輝度値とし、横列に5点並べた同一試料由来のスポットごとに平均値と標準偏差を算出した。

以降各レクチン試料に対するプローブの結合に対しては、この同一試料由来の5点の平均輝度値を用いて評価を行った。

【0088】

#### 2. 結果と考察

上記の実験では多様な特異性を持つレクチンを並べたアレイを作製し、既知の糖鎖構造を持つ糖タンパク質プローブをアプライした際の各レクチンスポットの蛍光パターンから、レクチンアレイとしての性能評価を行った。また本実験では、プローブのコアタンパク部分の情報も同時に取得することを目指し、糖タンパク質プローブのコアタンパク部分を認識する抗体もレクチンと並べてスポットしたハイブリッドアレイを作製した。モデル糖タンパク質としては、コアタンパク部分の構造は同一だが修飾糖鎖部分の構造が異なるタンパク質として、ASFとFETの組み合わせと、RNase AとRNase Bの組み合わせを選択した。

【0089】

実験(A)、(B)では、プローブとして用いたASFとFETの糖鎖プロファイルと比較した(図16A及びB)。FETはN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖を3本ずつ分子中に持ち、各糖鎖構造の非還元末端が高度にシアル酸で修飾されていることが知られている。一方、ASFはFET糖鎖のうち末端シアル酸を酵素或いは酸処理によって除去したタンパク質であり、ラクトサミン構造が露出している。このためASFプローブを用いた場合、ラクトサミンを認識するRCA120やECAのスポットが観察され、FETプローブを用いた場合、シアル酸を認識するSSA、SNAのスポットが観察されると予想された。また抗体スポットに対してはFETもASFもコアタンパク部分は同一であるため、両プローブ共に結合が観察されると予想された。実験の結果、末端ラクトサミン構造を持つASFプローブではRCA120やECAの非常に明るいスポットが検出されたが(図16A)、ラクトサミン構造がシアル酸でキャッピングされているFETプローブではRCA120、ECAのスポットは非常に暗くなった(図16B)。この結果はRCA120、ECAがラクトサミン構造を強く認識し、ラクトサミン構造の末端がシアル酸でキャップされると親和性が大幅に低下するという従来知見と一致していた。また実験(B)ではFETプローブに特徴的なシアル酸の存在に対応して、シアル酸認識レクチンであるSSAやSNAのスポットが観察された(図16B)。ConAのスポットでは実験(A)、(B)共に弱い蛍光が観察された(図16A及びB)。これはN-結合型糖鎖のうち、主として存在する3本鎖型糖鎖には結合できないものの、少量存在するとされる2本鎖型糖鎖には結合できるためと考えられた。共通コアタンパク部分を認識するFET抗体のスポットは、実験(A)、(B)において蛍光が観察された(図16A及びB)。

【0090】

実験(C)、(D)ではRNase A とRNase B プローブの糖鎖プロファイルの相違を比較した(図16C及びD)。RNase Bは、高マンノース型のN-結合型糖鎖を分子内に1本のみ持ち、RNase Aは、コアタンパク部分はRNase Bと同一の構造を持つが糖鎖を全く持たないことが知られている。これらのプローブをレクチンアレイに接触させた場合、両プローブ共に

10

20

30

40

50

抗RNase抗体スポットに対しては親和性を示すが、レクチンのスポットに対する反応性に相違が生じる(RNase BプローブはConAなどのマンノース認識レクチンに親和性を示すのに対し、RNase Aは親和性を示さない)ことが予想された。実験の結果、抗体に対する反応性では、両プローブにおいて共通コアタンパク部分を認識するRNase抗体との結合が観察された。一方レクチンに対する反応性では、高マンノース構造を持つRNase BでConAのスポットにおいて結合が観察されたが、糖鎖を持たないRNase Aではレクチンのスポットにおいて、結合による蛍光は観察されなかった。実験(E)ではネガティブコントロールとして、糖鎖を持たないタンパク質であるBSAを用いた。BSAプローブでは予想通り、抗体・レクチンスポットともに結合は観察されなかった(図16E)。

#### 【0091】

実験(A)~(E)を通して、微量の糖タンパク質試料から迅速に、レクチンの糖結合特異性を反映したプロファイルを得ることができた(図16A~E)。また今回の実験では、レクチンと抗体を同一アレイ上にスポットすることで、糖タンパク質のコアタンパク部分と、修飾糖鎖部分の情報を同時並行的に一枚のスライド上で取得することができた。同一スライド上で同時並行解析を行うことで、各反応槽間の実験条件(温度、反応時間等)を揃えた形での観察が可能となるという利点が生じた。

#### 【0092】

〔実施例3〕 レクチンアレイを用いた阻害濃度解析(図17)

##### 1. 材料と方法

先の実験で観察されたレクチンとプローブ分子間の結合が、糖鎖を介した特異的結合であることを確認する為に、競合阻害糖を用いた阻害実験を行った。実験(A)ではスライドガラス上の8つの反応槽内にRCA120をスポットしてアレイを構成した上で、競合阻害糖(ラクトース)の濃度を変えた8種類のASFプローブ溶液を同時に接触させ、結合反応の阻害を観察した(図17A)。実験(B)では固定化レクチンとしてConAを用い、プローブとしてRNase B、競合阻害糖としてマンノースを用い、同様の操作で結合の阻害を観察した(図17B)。アレイ作製時に要した材料・操作は、実施例2と同じであるため記述を省略する。

#### 【0093】

##### 2. 結果と考察

実験の結果、競合阻害糖の濃度上昇に伴ってスポットの蛍光強度の減少が観察され(図17)、阻害曲線をカーブフィッティングすることにより、阻害物質固有の半阻害濃度を算出することができた。この結果から、蛍光糖タンパク質プローブとの結合はレクチンと糖鎖間の特異的結合反応によるものであることを確認できた。またこのような阻害実験を用い、半阻害濃度を算出することで結合の強さを評価したり、結合する相手分子を探索したりすることが可能であることが示された。

#### 【0094】

〔実施例4〕 レクチンアレイの糖ペプチドプローブによる検出(図18)

##### 1. 材料と方法

###### (1) 糖ペプチドプローブの調製

実施例2(1)に記述した方法でCy3-ASFを調製した後に、このCy3-ASFをトリプシン処理により断片化し、Cy3-ASF ペプチドを調製した。

###### (2) スライドガラスへのGTMSコーティング

実施例2(2)に記述した方法で行った。

###### (3) レクチンアレイの作製

固定化するレクチンは、各レクチンの持つ主要な糖認識能ごとにグループ分けを行った上で、フコース認識レクチン5種、シアル酸認識レクチン6種、ラクトサミン構造認識レクチン3種、ガラクトース認識レクチン6種、ガラクトサミン認識レクチン11種、マンノース認識レクチン4種、キチン構造認識レクチン5種の計40種類のレクチンを選択し、スライドガラスに固定化したアレイを作製した。実験操作は実施例2(3)に記述した方法で行った。

10

20

30

40

50

- (4) 非スポット面のブロッキング
- (5) プローブ溶液の添加とスキャン
- (6) スキャン画像の数値化

上記(4)～(6)の操作については、Cy3-ASF ペプチドプローブを用い、実施例2(4)～(6)に記述した方法と同様の操作にて、実験を行った。

【0095】

## 2. 結果と考察

実験の結果、レクチンアレイに糖ペプチドプローブを供することで、糖鎖構造を反映した糖鎖プロファイルを得ることができた。得られた糖鎖プロファイルは酵素消化する前のASFと同等であり、レクチンアレイに糖タンパク質だけでなく糖タンパク質のペプチド消化産物をプローブとして利用できることが示された。この技術を用いれば糖ペプチドをHPLC等で分画した後にプローブとしてレクチンアレイに供することで、糖ペプチド各成分の糖鎖プロファイルの観察が可能になり、有用である。

10

【0096】

〔実施例5〕レクチンアレイに対し、クルードな生体試料をプローブとして用いた実験(図19)

## 1. 材料と方法

レクチンアレイを用いて糖タンパク質混合物、特に生体由来混合試料の糖鎖プロファイリングを行うことで、生体内の糖タンパク質の糖鎖付加状態を解析する。

20

【0097】

マウス肝臓より抽出・精製した糖タンパク質サンプルと、マウス脳より抽出・精製した糖タンパク質サンプルをCy3標識化してプローブとした後に、40種レクチンの固定化されたレクチンアレイと接触させて、マウス抽出糖タンパク質混合物全体の糖鎖プロファイルを観察した。

アレイ作製時に要した材料・操作は、実施例2と同じであるため記述を省略する。

【0098】

## 2. 結果と考察

マウス脳由来糖タンパク質プローブ(図19A)と肝臓由来糖タンパク質プローブ(図19B)では、明らかに異なった糖鎖プロファイルが観察された。特にシアル酸認識のレクチン群で、両プローブ間に顕著な相違が見られた。脳では糖タンパク質に対するシアル酸の付加が少ないことが知られており、この事実は実験結果の傾向と一致した。このようにクルードな試料を用いた実験でも、試料全体の糖鎖付加情報を迅速・簡便に得ることができるため、血液成分や臓器等の、個体間や病態間での糖鎖構造の差を一斉比較解析する目的での使用に適している。

30

【0099】

次に先の実験で用いた脳由来糖タンパク質プローブに対し、競合阻害糖としてラクトースを10 mM加え、糖鎖プロファイルを観察した(図19C)。その結果、競合阻害により蛍光シグナルのパターンに変化が観察され、主にラクトサミン認識レクチンのシグナルの減弱が観察された。この実験で示したように、よりクルードな試料に対するレクチンアレイによる糖鎖プロファイリングにおいても、様々な阻害糖の添加実験を併用し、取得される情報を絞り込んだ上で比較解析することで、より簡便かつ迅速に個体間の比較解析を行うことができる。

40

【0100】

〔実施例6〕レクチン-糖タンパク質間相互作用の経時的観察(図20)

本装置はスキャンの際に洗浄工程を必要とせず、液層中の相互作用を平衡状態のまま観察できるため、反応開始から時間を追ってシグナル強度の変化を観察することで、相互作用の結合・解離反応の経時的観察(リアルタイムスキャン)が可能である。

【0101】

50

特異性の異なる多種のレクチンを固定化した基板に対し、100 ng/mLのCy3-ASFを蛍光糖タンパクプローブとして反応槽内に加え、結合反応を開始させた直後からのシグナル強度の経時変化を観察した。他の実験条件は実施例1と重複するので省略する。本実験ではスキャン間隔を60秒ごととし、スキャンを行った。結果、反応速度の相違による結合反応の速さの相違が観察された(図20)。このようなリアルタイムスキャンは、反応速度を観察することを可能とするだけでなく、測定条件における平衡反応の終点を見極める上でも有用である。

### 【0102】

〔実施例7〕 酵素消化を併用した糖タンパク質の糖鎖構造推定法(図21)

10

#### 1. 材料と方法

##### (1) 糖タンパク質プローブの調製および酵素消化

実施例2(1)に記述した方法でCy3標識ウシトランスフェリン(Cy3-bTf)を調製した後に、Cy3-bTfを糖質加水分解酵素(シアリダーゼAもしくはガラクトシダーゼ)で消化した。

### 【0103】

##### (2) スライドガラスへのGTMSコーティング

実施例2(2)に記述した方法で行った。

##### (3) レクチンアレイの作製

固定化するレクチンは、各レクチンの持つ主要な糖認識能ごとにグループ分けを行った上で、フコース認識レクチン5種、シアル酸認識レクチン6種、ラクトサミン構造認識レクチン3種、ガラクトース認識レクチン6種、ガラクトサミン認識レクチン11種、マンノース認識レクチン4種、キチン構造認識レクチン5種の計40種類のレクチンを選択し、スライドガラスに固定化したアレイを作製した。実験操作は実施例2(3)に記述した方法で行った。

20

### 【0104】

##### (4) 非スポット面のブロックング

##### (5) プローブ溶液の添加とスキャン

##### (6) スキャン画像の数値化

上記(4)~(6)の操作については、Cy3-bTf酵素消化物プローブを用い、実施例2(4)~(6)に記述した方法と同様の操作にて、実験を行った。

30

### 【0105】

#### 2. 結果と考察

実験の結果、レクチンアレイに各糖質加水分解酵素処理した糖タンパク質プローブを供することで、反応産物の糖鎖構造を反映した糖鎖プロファイルを得ることができた(図21)。シアリダーゼA消化した場合、反応前後で大きなプロファイルの変動を示したが、

ガラクトシダーゼ反応産物は未反応糖タンパク質とほぼ同一のプロファイルを示した(図21)。これはbTfのN結合型糖鎖の非還元末端のほとんどがシアル酸修飾を受けていることを示している。以上のように各糖質加水分解酵素の基質特異性をもとに酵素反応前後の糖鎖プロファイルを比較することで、標的糖タンパク質の糖鎖構造をより正確に推定することが可能になった。

40

### 【0106】

〔参考例1〕 糖ペプチドアレイによる、糖ペプチド上の糖鎖プロファイリング(図22)

#### 1. 材料と方法

##### (1) レクチンプローブの調製

本実施例ではレクチンプローブとして、ラクトサミン構造を強く認識するRCA120、ネガティブコントロールとして糖結合能を持たないBSAを使用した。蛍光標識レクチンプローブは蛍光色素であるCy3を用いて蛍光標識して調製した。レクチンは0.1 M 炭酸緩衝液(p

50

H 9.3) 中に終濃度1 mg/mLになるよう溶解した後、1 mL当たり1.0 mgのCy3粉末と混合させ、1時間、適時攪拌しながら暗所で反応させた。反応後は限外ろ過フィルターキットを用いて未反応のCy3色素を除去した。

(2) スライドガラスへのGTMSコーティング

GTMSコートスライドは実施例1(2)に記述した方法で行った。

【0107】

(3) 糖ペプチドアレイの作製

(2)で作製したGTMSコートスライドガラス(図1)に対して糖ペプチドをスポットして糖ペプチドアレイを作製した。マイクロアレイスポッターとして日本レーザ電子社製STAMPMANを使用し、先端直径0.40 mmのスタンプピンを使用してスポットを行くことで、直径約0.5 mmのスポットをスライドガラス上に配置した。

本実験では固定化した糖ペプチドサンプルは、マウス肝臓の可溶性画分からレクチンカラムを用いて精製した糖タンパク質画分をトリプシンによりペプチド断片化後、HPLCにより分画・分取した糖ペプチドを用いた。スライドガラスへの糖ペプチドの固定化操作に際しては、以下の条件をマイクロアレイスポッター付属のコンピューターに記憶させ、スタンプピン動作プログラムを実行させた。まずスタンプピンを96穴PCR用マイクロタイタープレート内の固定化試料溶液中に1秒間浸した後に引き上げ、スライドガラス表面の所定の位置に1秒間接触させた。この動作を1スポットごとに繰り返しながら、同一試料溶液から横1列に6点スポットを行った後、スタンプピンの洗浄を行った。洗浄工程ではスタンプピンの針先を0.05% SDS溶液に2秒間浸し、スタンプピンをバキューム装置内で15秒間乾燥させ、さらに精製水に2秒間浸した後に、バキューム装置内で15秒間乾燥、最後にエタノールに2秒間浸してからバキューム装置内で15秒間の乾燥操作を行った。

【0108】

(4) 非スポット面のブロックング

(5) プローブ溶液の添加とスキャン

(6) スキャン画像の数値化

上記(4)~(6)の操作については、Cy3-RCA120プローブとCy3-BSAプローブを用い、実施例2(4)~(6)に記述した方法に従い、実験操作を行った。

【0109】

2. 結果と考察

本実験の結果、糖ペプチドをアレイ化することで、糖ペプチドに付加した糖鎖の構造情報を、ハイスループットかつ容易に得られることが示された。糖ペプチドアレイの作製方法としては、1) 精製糖ペプチドを固定化する、2) クロードの糖ペプチドを固定化する、3) HPLCで分離した糖ペプチドフラクションを固定化する、などが考えられる。今回の実験ではHPLCで分離した各フラクションをアレイ化したものを作製でき、有用であることを示すことができた。

【0110】

従来、HPLCで分画したフラクションのうち、どこに糖ペプチドが含まれているかという情報を得ることは、UV吸収や蛍光等でモニターできないために容易ではなかった。本実験の結果、各糖ペプチドフラクションを固定化したアレイを用いることで、どのフラクションにどのような糖鎖構造を持った糖ペプチドがあるのかを容易に知ることが可能となることが分かった。

【0111】

本法を利用することで、解析対象の糖鎖を持つ糖ペプチドがどのフラクションに含まれているのかといった情報を迅速に得ることができ、多数のフラクションから効率的に糖鎖の含まれるフラクションのみを選出し、質量分析など他の解析へと供すること等が可能になる。また解析対象の糖ペプチドの糖鎖構造情報や、どのようなレクチンが結合するかという情報がない場合、トリプシン消化前の糖タンパク質の状態でレクチンアレイを用いた分析を行い、糖鎖プロファイリングを行うことで、当該糖タンパク質に結合するレ

クチンを数十種類のレクチンの中から絞り込むことが出来る。このような情報が得られることで、従来多数のレクチンを用いて総当り的に行っていたレクチンプロットなどの操作が簡略化され、大幅に時間と労力を節約できるなどの利点がある。

【 0 1 1 2 】

〔参考例 2〕他の糖鎖関連アレイへの応用

糖鎖関連アレイには、糖鎖をプローブに用いるレクチンアレイの他、糖タンパク質をプローブに用いるレクチンアレイ、レクチンをプローブに用いる糖ペプチドアレイ、レクチンをプローブに用いる糖タンパク質アレイ、レクチンをプローブに用いる抗体アレイの 5 タイプが挙げられる。図 2 3 に、各糖鎖関連アレイと糖鎖の相互作用の模式図を示す。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 3 】

【図 1】ガラス表面に対するGTMSの反応過程を示す模式図である。

【図 2】本発明の糖鎖あるいは複合糖質の解析に用いる基板の作製方法の概略を示す図である。

【図 3】本発明の糖鎖あるいは複合糖質の解析装置の一例を示す図である。

【図 4】本発明の情報処理システムの一例を示す図である。

【図 5】コンピューターの外部にデータベースを格納したシステムの一例を示す図である

20

【図 6】コンピューター内部にデータベースを格納したシステムの一例を示す図である。

【図 7】本発明のシステムにおけるコンピューター構成図の一例を示す図である。

【図 8】本発明の解析装置において用いるプログラムのパターン化処理のフローチャートを示す図である。

【図 9】図 8 のプログラムにより処理された結果を示すパターン化情報を示す図である。

【図 10】本発明の糖鎖あるいは複合糖質の解析装置の外観の一例を示す図である。

【図 11】本実施例で用いた 8 つの反応槽を形成させた基板を示す図である。

【図 12】2 種のレクチンを固定化したアレイ上にCy3-ASF溶液を加えた、レクチンアレイの性能実験の概念図である。

30

【図 13】固定化時のレクチン溶液濃度とスポットの蛍光強度との関係を示す図及び写真である。

【図 14】レクチン-糖鎖相互作用の検出と、阻害糖による相互作用への影響を示す図及び写真である。

【図 15】阻害糖のレクチン-糖鎖相互作用への影響をグラフとして示す図である。

【図 16】レクチン-抗体ハイブリッドアレイの実施例を示す写真である。

【図 17】8 つの反応槽を使用して、同一スライド上に異なる濃度の阻害糖を共存させて、相互作用の阻害を観察した結果を示す写真及び図である。(A) RCA120とASFの結合にラクトースを加えたケース、(B) ConAとRNaseBの結合にマンノースを加えたケースである

40

【図 18】レクチンアレイの検出に糖ペプチドプローブを用いる実験の結果を示す写真及び図である。

【図 19】生体由来のクルードな試料をプローブ化した際のレクチンアレイによる解析結果を示す写真である。

【図 20】2 種のレクチン (RCA120, ECA) に対して、100ng/mL の Cy3-ASF プローブを反応させた際の正味のシグナル強度の経時変化をリアルタイムスキャン機能を用いて観察した図である。

【図 21】糖質加水分解酵素消化によるウシトランスフェリンの糖鎖プロファイル変化を示した図である。実線：酵素消化によりシグナルの増加が観察されたレクチン。点線：酵素消化によりシグナルの低下が観察されたレクチン。

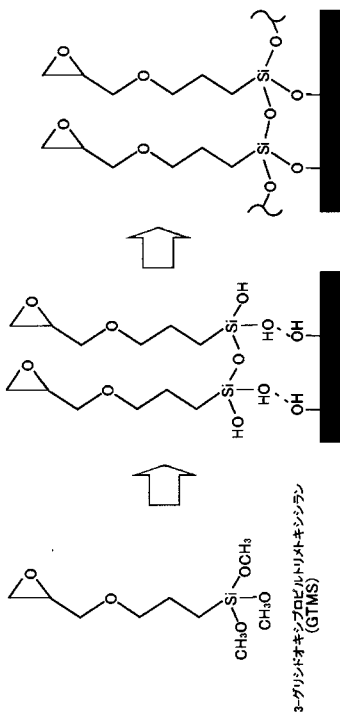
50

【図 2 2】マウス肝由来糖ペプチドサンプルのHPLC分画フラクションを固定化した、糖ペプチドアレイの検出実験の結果を示す図及び写真である。図中、Fucはフコース認識レクチン群、Siaはシアル酸認識レクチン群、Lacはラクトース認識レクチン群、Galはガラクトース認識レクチン群、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン認識レクチン群、Manはマンノース認識レクチン群、Chitinはキチン認識レクチン群を意味する。

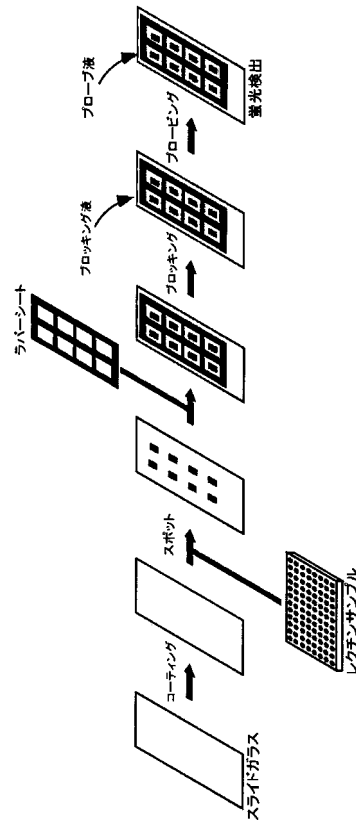
【図 2 3】各糖鎖関連アレイと糖鎖の結合の様子を示す模式図である。A：レクチンアレイ、およびプローブとして糖鎖を用いた場合の、アレイに対するプローブの結合状態を示す模式図である。B：レクチンアレイ、およびプローブとして糖タンパク質を用いた場合の、アレイに対するプローブの結合状態を示す模式図である。C：糖ペプチドアレイ、およびプローブとしてレクチンを用いた場合の、アレイに対するプローブの結合状態を示す模式図である。分画したペプチド上の糖鎖構造の類推に用いることができる。D：糖タンパク質アレイ、およびプローブとしてレクチンを用いた場合の、アレイに対するプローブの結合状態を示す模式図である。E：抗体アレイ、およびプローブとしてレクチンを用いた場合の、アレイに対するプローブの結合状態を示す模式図である。

10

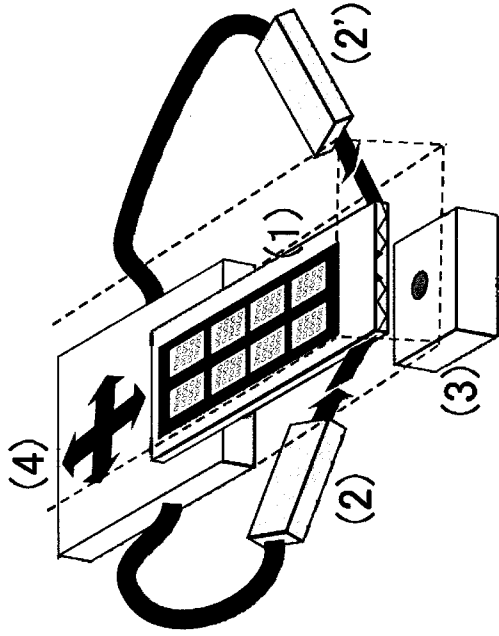
【図 1】



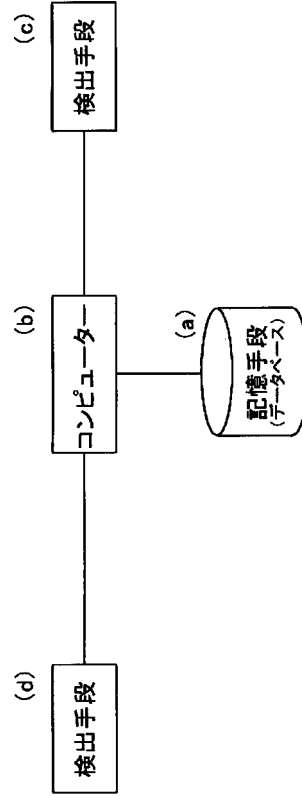
【図 2】



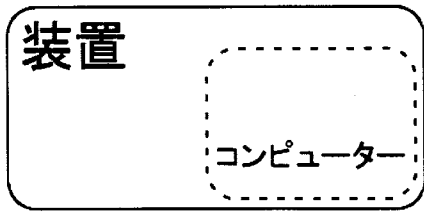
【図3】



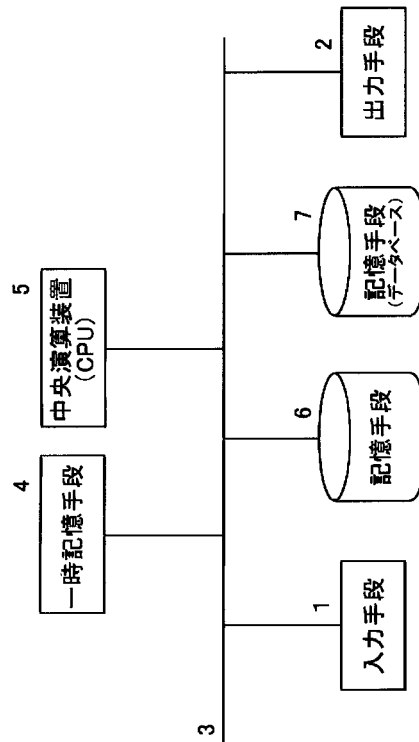
【図4】



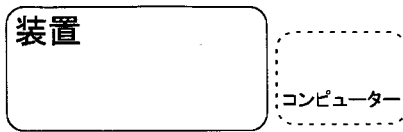
【図5】



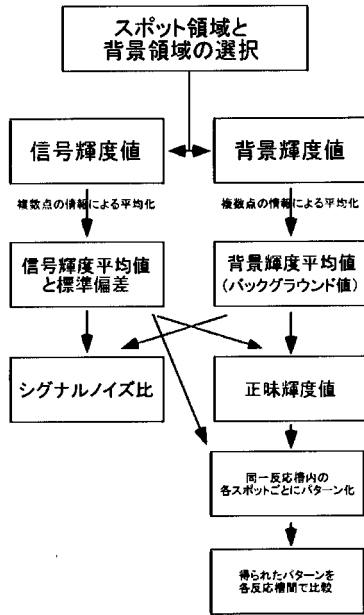
【図7】



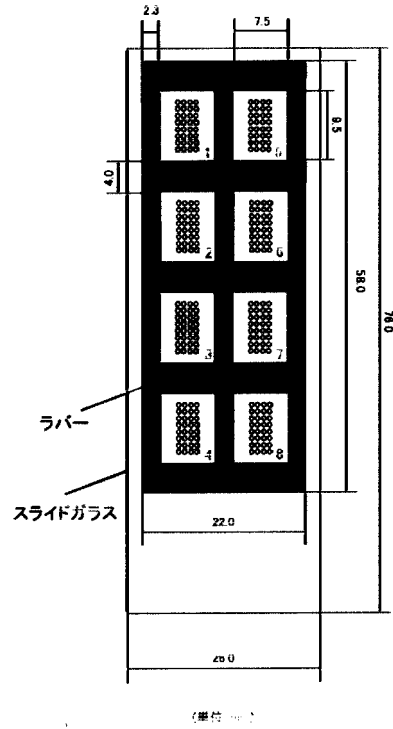
【図6】



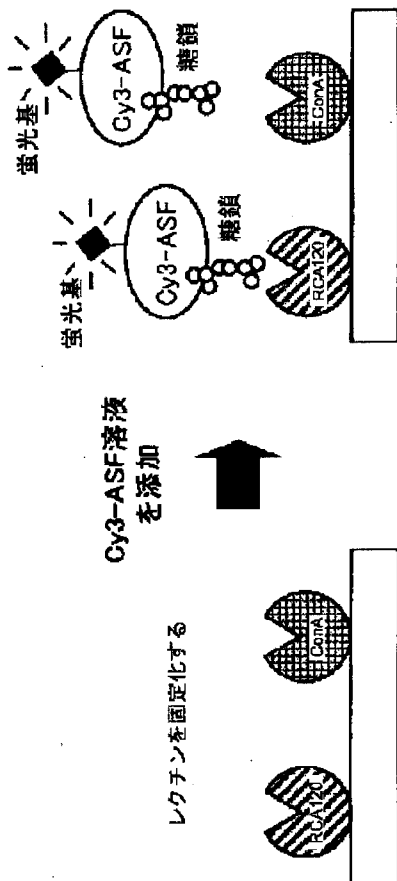
【図8】



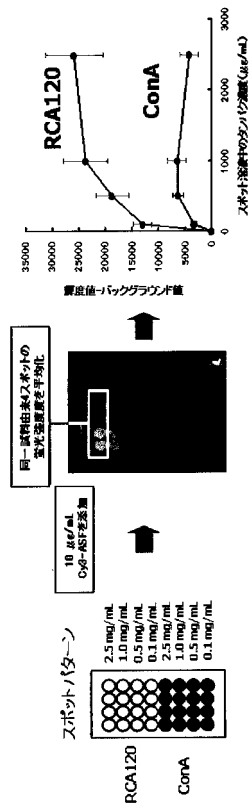
【図11】



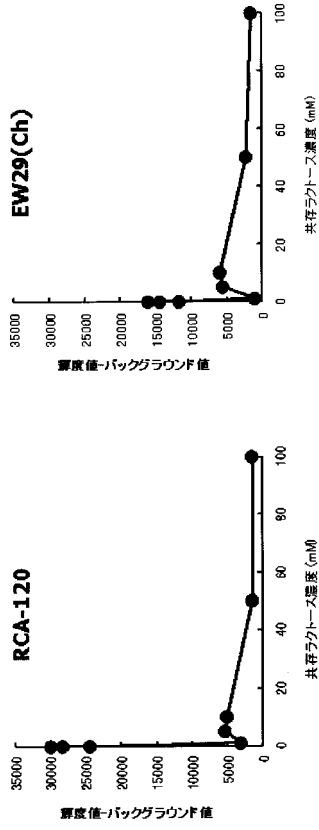
【図12】



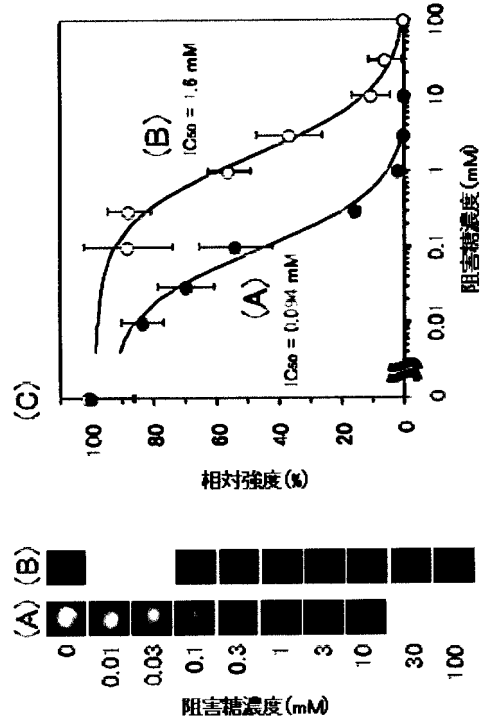
【図13】



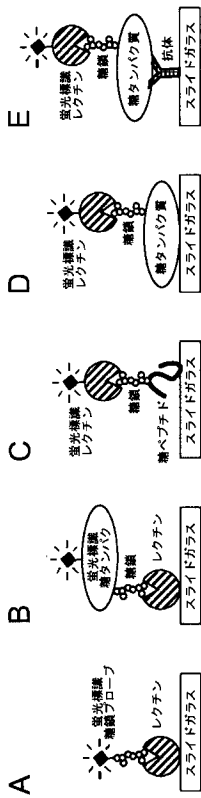
【 図 1 5 】



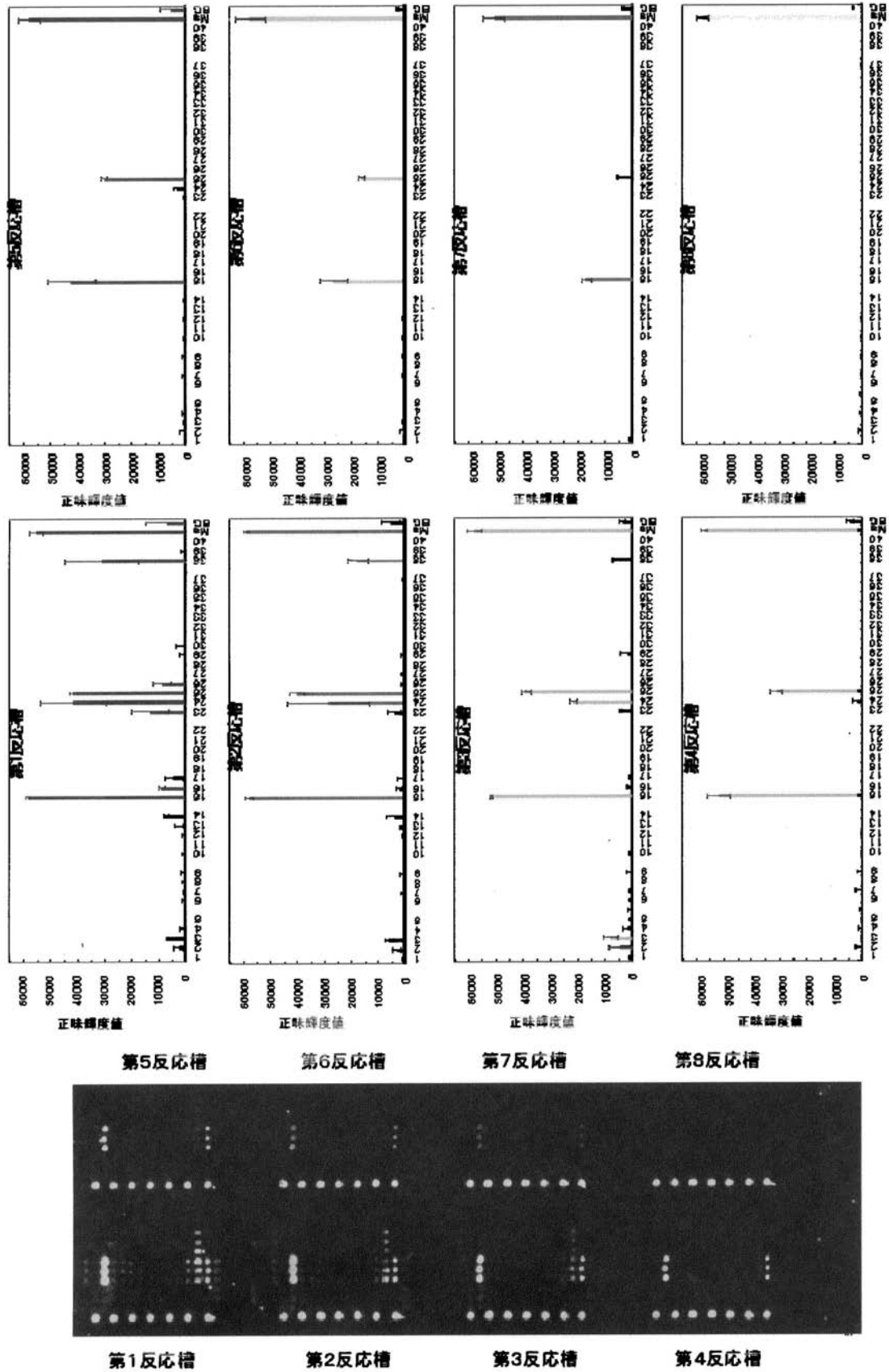
【 図 1 7 】



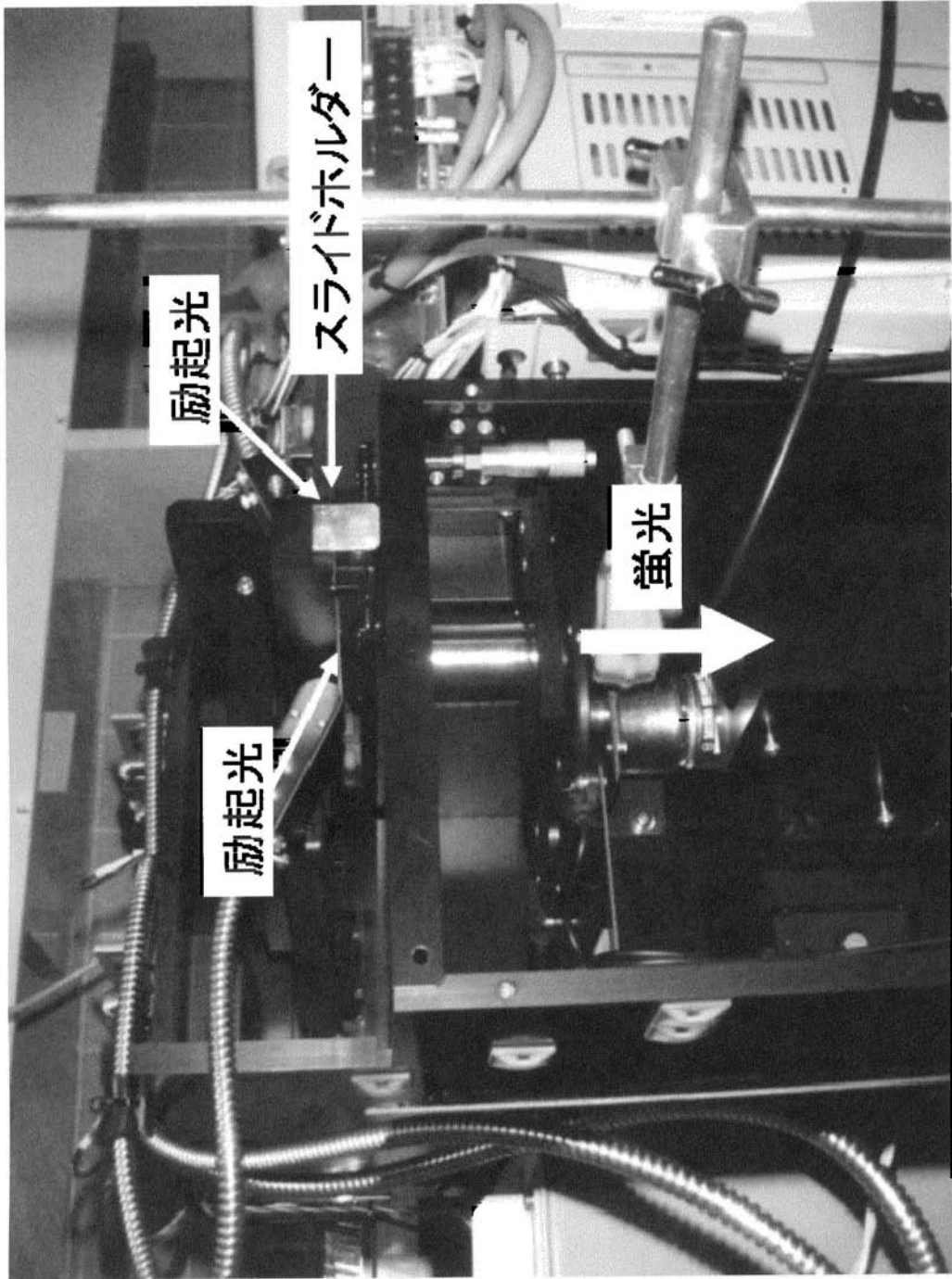
【 図 2 3 】



【 図 9 】



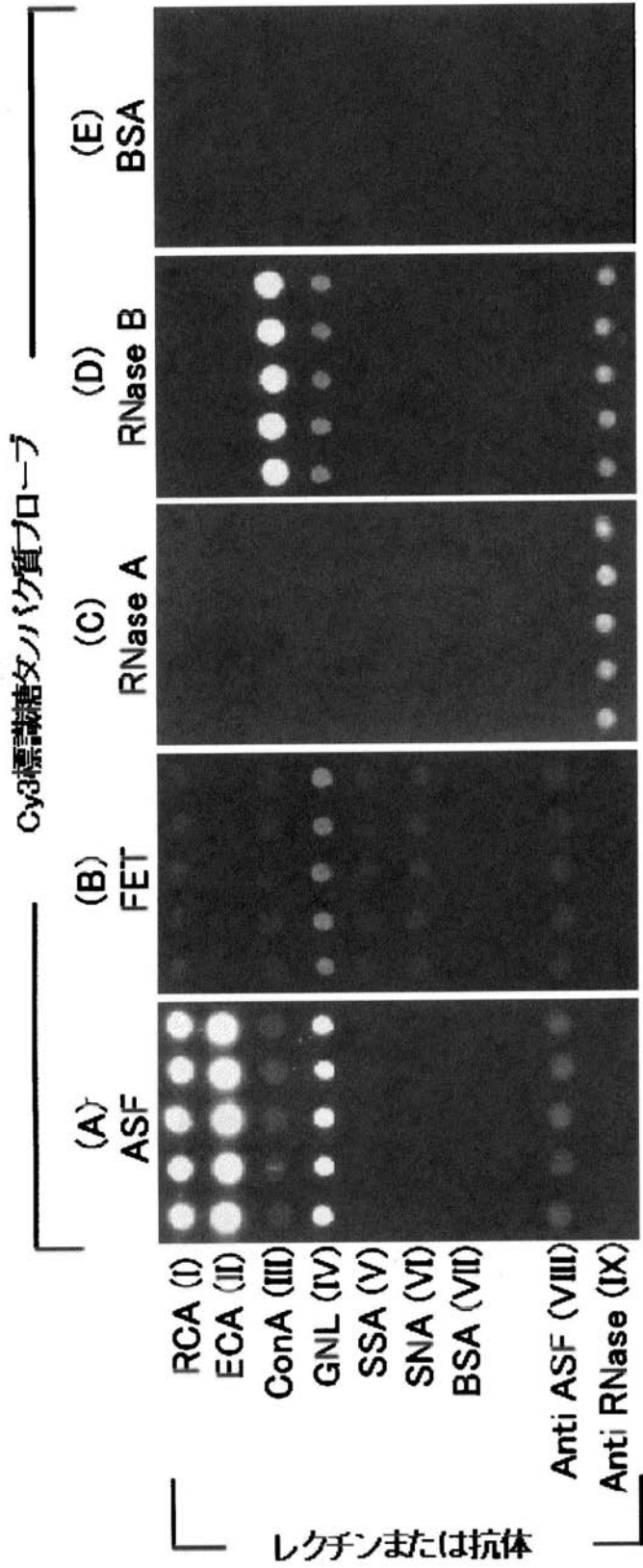
【図10】



カメラ部

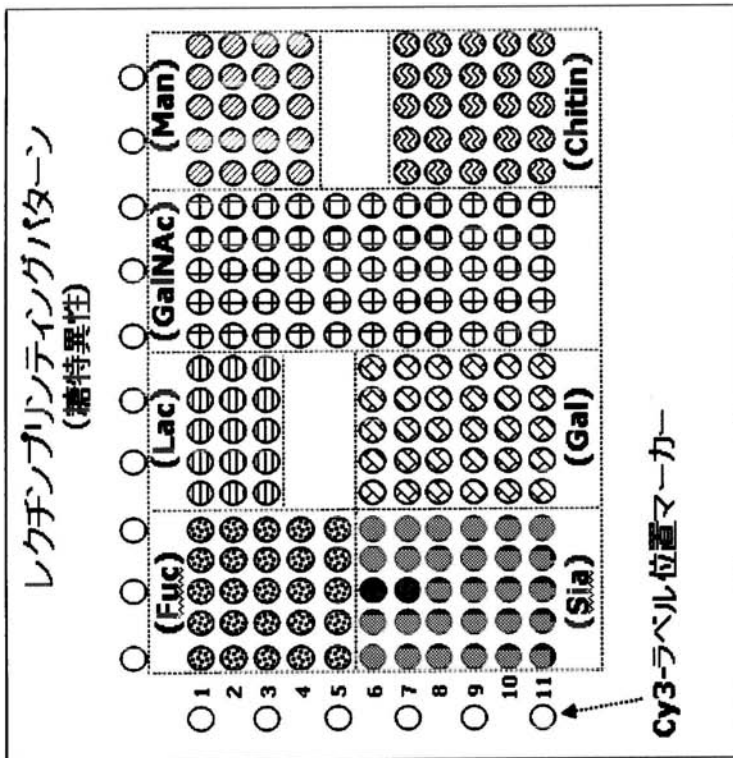
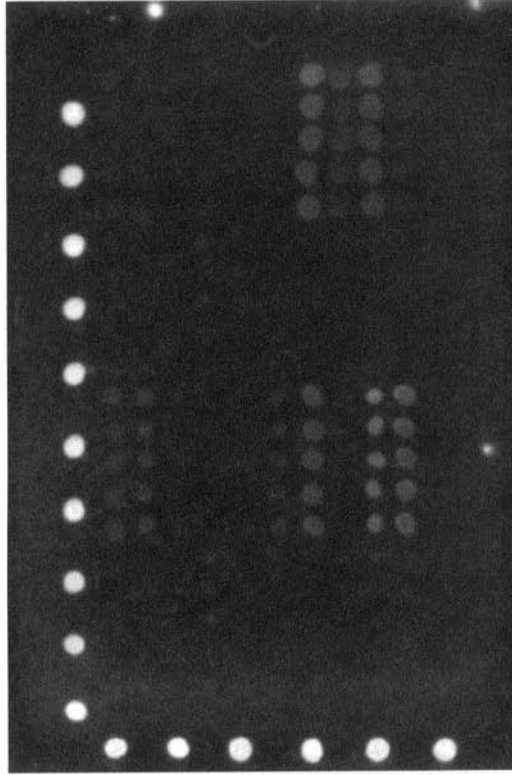


【 図 16 】



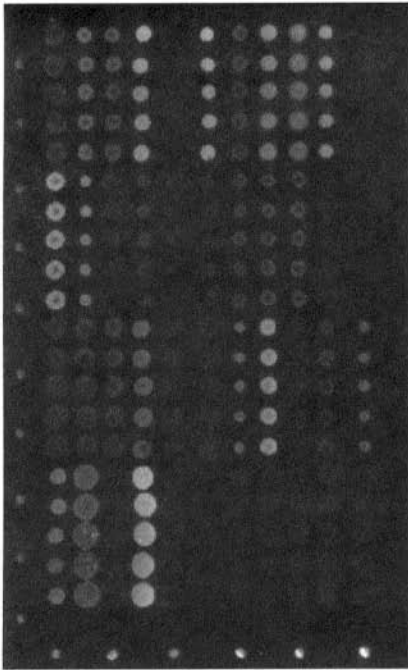
【 図 18 】

# Cy3-ASF ペプチドプローブ

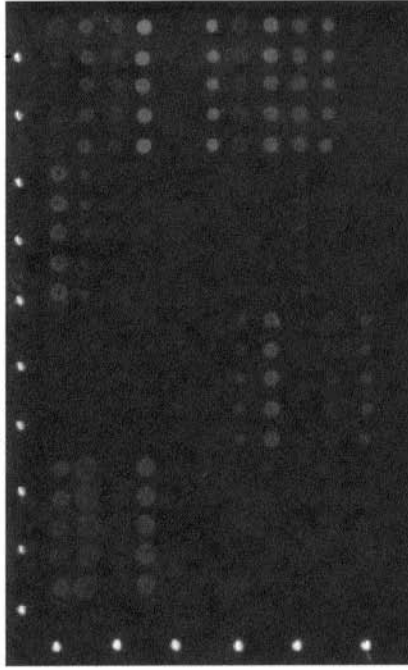


【 図 19 】

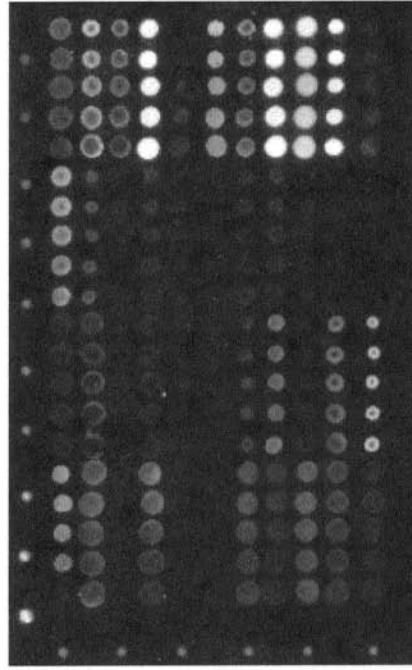
(A) マウス脳由来糖タンパク質プローブ



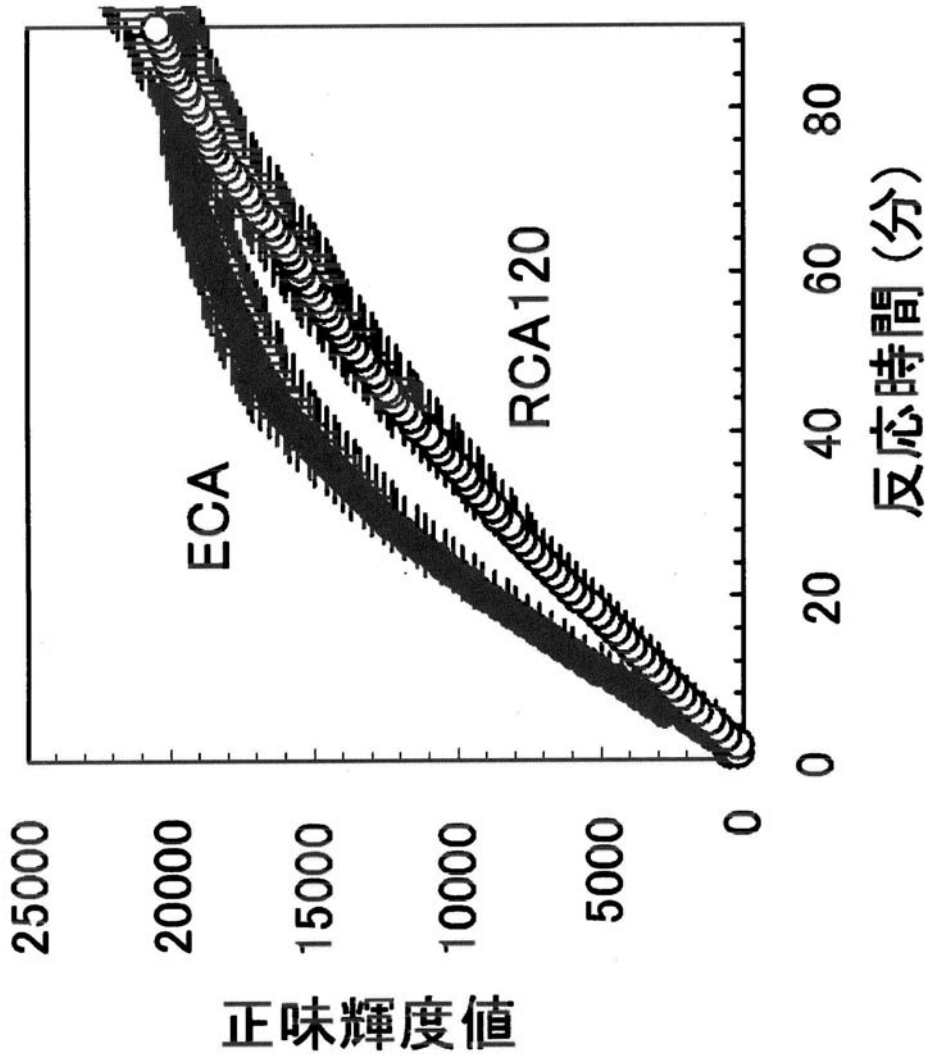
(C) マウス脳由来糖タンパク質プローブ  
+ 10 mM ラクトース



(B) マウス肝臓由来糖タンパク質プローブ

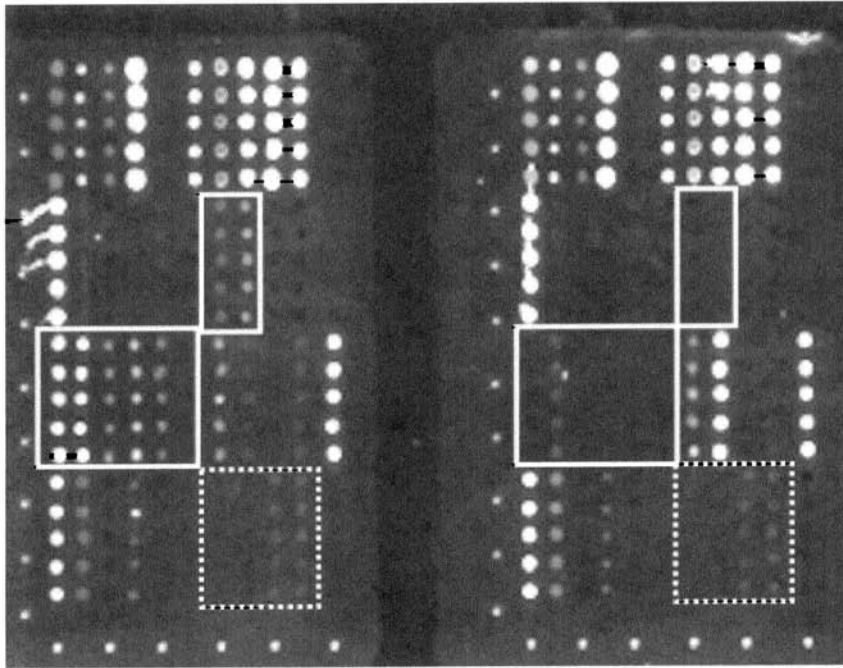


【図20】



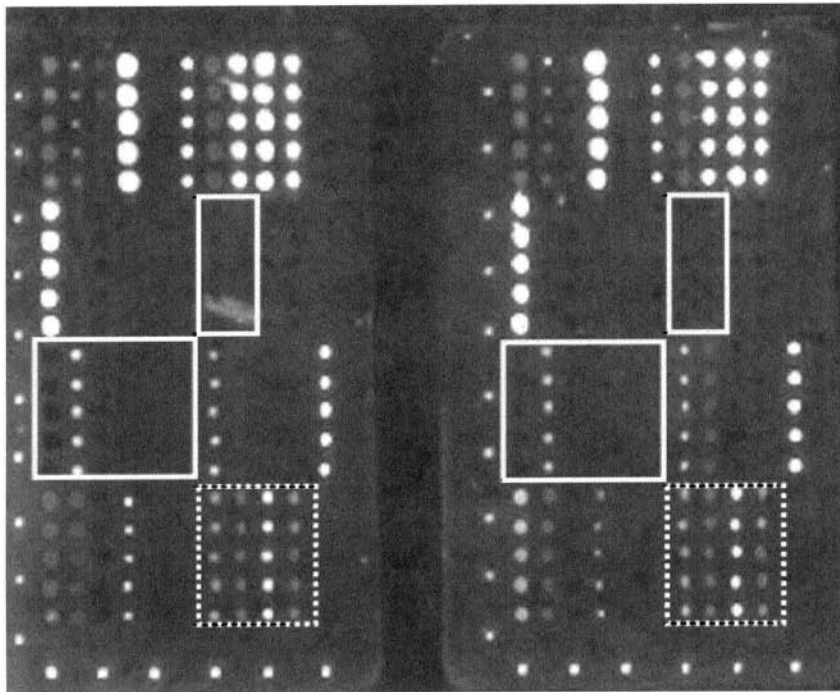
【図 21】

シアリダーゼA消化後



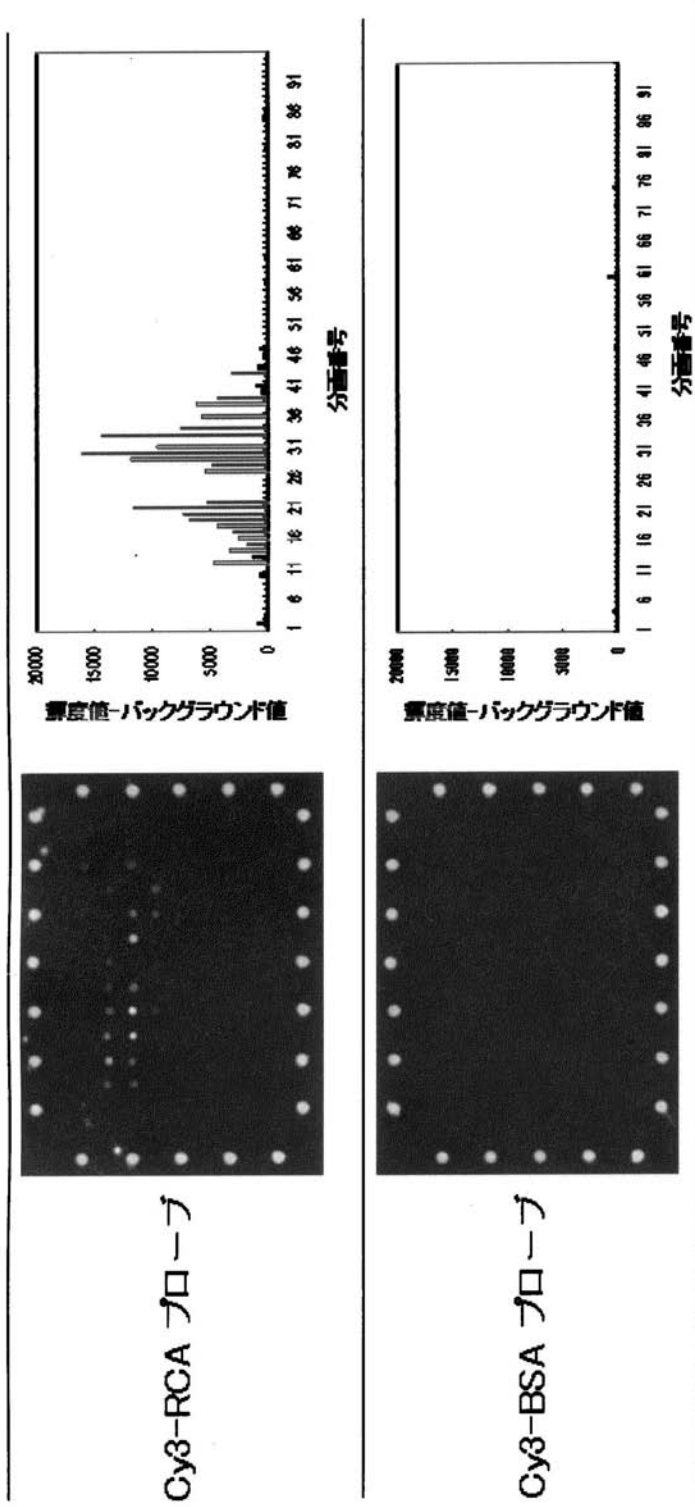
シアリダーゼAおよび  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化後

酵素消化なし



$\beta$ -ガラクトシダーゼ消化後

【 図 2 2 】



## フロントページの続き

## (56)参考文献 特開2003-256407(JP, A)

内山 昇他, エパネッセント励起蛍光検出型マイクロアレイによる糖鎖 - レクチン間相互作用解析, 第27回日本分子生物学会年会 プログラム・講演要旨集, 2004年12月 8日, Vol. 27th, p.750, 2PB-180

Roche Applied Science BIOCHEMICA 機器システムバージョン , 2002年, Vol.01

ZENG, Analysis of specific interactions of synthetic glycopolypeptides carrying N-acetyllactosamine and related compounds with lectins, , Carbohydrate Research , 1998年, Vol.312, p209-217

OKAZAKI, BIACORE Applications for Glycoconjugate Research, Trends in Glycoscience and Glycotechnology , 1998年, Vol.10, No.54, p321-329

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

G01N 21/64

G01N 21/78

G01N 37/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed