(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4132694号
(P4132694)

(45)発行日　平成20年8月13日(2008.8.13)　(24)登録日　平成20年6月6日(2008.6.6)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/435	(2006.01)	C07K	14/435	
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D

請求項の数 19　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-66198(P2001-66198)
(22)出願日　平成13年3月9日(2001.3.9)
(65)公開番号　特開2001-322999(P2001-322999A)
(43)公開日　平成13年11月20日(2001.11.20)
審査請求日　平成16年11月16日(2004.11.16)
(31)優先権主張番号　特願2000-67622(P2000-67622)
(32)優先日　平成12年3月10日(2000.3.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町４丁目１番８号
(74)代理人　100102668
弁理士　佐伯　憲生
(72)発明者　中村　英士
愛知県名古屋市千種区不老町１番地　名古屋大学大学院生命農学研究科
(72)発明者　大場　裕一
愛知県名古屋市千種区不老町１番地　名古屋大学大学院生命農学研究科
(72)発明者　中村　光裕
愛知県名古屋市千種区不老町１番地　名古屋大学大学院生命農学研究科

最終頁に続く

(54)【発明の名称】受容体認識部位が保存された生理活性物質の誘導体及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

受容体の内部の作用部位に結合して毒性を発現するペプチド又はタンパク質からなる毒物において、当該ペプチド又はタンパク質の受容体認識部位以外のアミノ酸残基の官能基にリンカーを結合し、当該リンカーの他端にビオチンを介してアビジンを結合させることからなり、その際のリンカーの長さは、上記ペプチド又はタンパク質の受容体認識部位と受容体の作用部位とが結合できない長さである、ペプチド又はタンパク質の受容体認識部位を保存したまま無毒化する方法。

【請求項２】

ペプチド又はタンパク質からなる毒物の、受容体認識部位以外のアミノ酸残基を官能基を有するアミノ酸残基へ置換して、当該アミノ酸残基の官能基にリンカーを結合させてなる請求項１に記載の方法。

【請求項３】

ペプチド又はタンパク質からなる毒物の受容体認識部位以外のアミノ酸残基が、そのアミノ酸配列情報からみて立体的に受容体認識部位の背面部分である請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

受容体が、イオンチャネルである請求項１～３のいずれかに記載の方法。

【請求項５】

イオンチャネルが、ナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルである請求項４に記載

の方法。
【請求項６】
ペプチド又はタンパク質からなる毒物がμ－コノトキシンである請求項３に記載の方法。
【請求項７】
受容体の内部の作用部位に結合して毒性を発現するペプチド又はタンパク質からなる毒物において、当該ペプチド又はタンパク質の受容体認識部位以外のアミノ酸残基を官能基を有するアミノ酸残基へ置換して、当該アミノ酸残基の官能基にリンカーを結合し、当該リンカーの他端にビオチンを介してアビジンを結合させることからなり、その際のリンカーの長さは、上記ペプチド又はタンパク質の受容体認識部位と受容体の作用部位とが結合できない長さである、ペプチド又はタンパク質からなる毒物の無毒化物。
【請求項８】
ペプチド又はタンパク質からなる毒物の受容体認識部位以外のアミノ酸残基が、そのアミノ酸配列情報からみて立体的に受容体認識部位の背面部分である請求項７に記載の無毒化物。
【請求項９】
リンカーが、両端に官能基を有する異種原子を有してもよい炭素数１～３０の化合物からなる請求項７又は８に記載の無毒化物。
【請求項１０】
受容体が、イオンチャンネルである請求項７～９のいずれかに記載の無毒化物。
【請求項１１】
イオンチャネルが、ナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルである請求項１０に記載の無毒化物。
【請求項１２】
ペプチド又はタンパク質からなる毒物がμ－コノトキシンである請求項８に記載の無毒化物。
【請求項１３】
μ－コノトキシンの受容体認識部位以外のアミノ酸残基を官能基を有するアミノ酸残基への置換が、５位のトレオニンをシステインへの置換である請求項１２に記載の無毒化物。
【請求項１４】
請求項７～１３のいずれかに記載の無毒化物からなる生理活性物質の受容体認識部位が保存された無毒化抗原。
【請求項１５】
請求項１４に記載の無毒化抗原を、ヒトを除く動物に感作させて免疫させ、当該抗原に対する抗体を製造する方法。
【請求項１６】
請求項１４又は１５に記載の無毒化抗原に対する抗体。
【請求項１７】
抗体がモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である請求項１６に記載の抗体。
【請求項１８】
受容体の内部の作用部位に結合して毒性を発現するペプチド又はタンパク質からなる毒物において、その受容体認識部位以外のアミノ酸残基の官能基に、当該受容体認識部位と受容体の作用部位とが結合できない長さのリンカーを結合し、当該リンカーの他端にはビオチンを結合させたペプチド又はタンパク質からなる毒物を、受容体に作用させて当該ペプチド又はタンパク質からなる毒物の受容体認識部位を受容体の作用部位にあらかじめ結合させ、次いでアビジンで処理して、当該受容体の活性の変化量を測定することからなる当該受容体と当該ペプチド又はタンパク質からなる毒物との親和性を測定する方法。
【請求項１９】
リンカーの長さを変えて測定する請求項１８に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質の生理活性を非活性化する方法、その非活性化誘導体、それに対する抗体、及びその利用方法に関する。また、本発明は、生理活性を保持したままの同生理活性物質の誘導体及びその利用方法に関する。
より詳細には、本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法、その非活性化誘導体、それに対する抗体、及びその利用方法と、
当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る（又は担体と親和性を有する）物質或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体、及びその利用方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
蛇、サソリ、貝などの動物が毒素をもっていることがあり、これらの毒素は神経細胞の作用を抑制して、他の動物を動けなくしたり、殺したりすることがある。これらの毒素の多くは細胞の受容体（チャネルなどを含む）に作用することが知られている。
これらの毒素に対するワクチンなども作製されているが、これらの毒素そのものに対する抗体を作製することは困難な場合が多い。なぜならば、抗体を作製するためにこれらの毒素を動物に感作させると、多くの場合感作させられた動物が抗体を作る前に死亡することが多いからである。
例えば、イモ貝より単離されたμ－コノトキシンは、筋肉などの細胞のナトリウムイオンチャネルを選択的に阻害するペプチド毒であるが、このものの抗体を作製することも困難であった。
【０００３】
また、従来は生理活性物質の生理活性を抑制するために、生理活性部位に着目して、この部位を化学修飾などをすることにより、その生理活性を調整することが行われてきた。例えば、前述した毒素の場合には加熱して変性させるなどして、生理活性部位を変性させることにより弱毒化することが行われてきた。
しかし、生理活性部位を化学的又は物理的に変えた場合には、当該生理活性物質の生理活性自体が変更されることから、それに対する抗体を製造することはできない。
【０００４】
さらに、生理活性物質が作用する受容体の、作用部位の深さや、当該受容体の入口の大きさなどを計測しようとする場合には、受容体の立体構造を決定しなければならず、煩雑な操作が必要とされていた。
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、このような従来の問題点を解決するために、生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質の生理活性を非活性化する方法、及びその非活性化誘導体、並びに化学修飾後も生理活性が保持されたままの生理活性物質の誘導体を提供するものである。
また、本発明は受容体の入口の大きさや、作用部位の深さを測定するための新規な方法を提供するものでもあり、更には新しいナトリウムチャネルやカルシウムチャネルを単離する方法を提供するものでもある。
【０００５】

【課題を解決するための手段】
本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分にリンカーを結合し、当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることからなる生理活性物質の受容体認識部位を保存したまま当該生理活性物質を非活性化する方法、及びその非活性化誘導体、並びにそれに対する抗体及びその製造方法に関する。
また、本発明は、細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該生理活性物質の受容体認識部位を受容体に結合し得る状態とし、次いで当該細胞系を受容体に侵入することができない物質で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体と生理活性物質との親和性を測定する方法、細胞を、リンカーの一端に受容体に侵入することができない物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の入口と当該生理活性物質の作用部位との距離を測定する方法、及び、細胞を、受容体の作用部位に達しない長さのリンカーの一端に受容体の入口の大きさに応じた物質が結合している前記した生理活性物質の非活性化誘導体で処理して、当該受容体の活性を測定することからなる当該受容体の入口の大きさを測定する方法などの受容体の特性を測定又は計測する方法に関する。
更に、本発明は、受容体の内部の作用部位に結合して生理活性を発現する物質において、当該生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定するか、又は当該リンカーの他端に担体に固定し得る（又は担体と親和性を有する）物質或いは担体に固定された物質と親和性を有する物質を結合させてなる、生理活性が保持された生理活性物質の誘導体に関する。
更にまた、本発明は、当該生理活性が保持された生理活性物質の誘導体を用いるナトリウムチャネル又はカルシウムチャネルの単離方法に関する。
【０００６】
受容体としてイオンチャネルを例にして本発明の概要を説明する。
図１は、細胞膜２に貫通して設けられているイオンチャネル１に、生理活性物質４、この例では毒物として作用する生理活性物質４がイオンチャネル１の作用部位３に結合している状態を模式的に示すものである。生理活性物質３の受容体認識部位５が、当該生理活性物質に対するイオンチャネル１の作用部位３に結合することにより、イオンチャネル１が塞がれイオンが細胞内に入ってこれなくなり、その結果細胞に異常が生じることになる。
【０００７】
図２は本発明のひとつの態様を示したものである。生理活性物質４はリンカー６により、受容体に侵入することができない物質７に結合しており、リンカー６の長さが十分でないために生理活性物質４の受容体認識部位５と、イオンチャネル１の作用部位３とが結合することができず、その結果生理活性物質４によりイオンチャネル１を塞ぐことができず、イオンはイオンチャネル１を自由に通過することができる。その結果、生理活性物質４は受容体認識部位５をその活性な化学構造を保持しているにもかかわらず、イオンチャネル１に対する活性が非活性化されることになる。
【０００８】
図３は本発明の他のひとつの態様を示したものである。生理活性物質４はリンカー６により、受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質８に結合しており、この物質８は受容体に侵入することができない物質７に親和力により結合している。そして、前記した図２の場合と同様に、リンカー６の長さが十分でないために生理活性物質４の受容体認識部位５と、イオンチャネル１の作用部位３とが結合することができず、その結果生理活性物質４によりイオンチャネル１を塞ぐことができず、イオンはイオンチャネル１を自由に通過することができる。その結果、生理活性物質４は受容体認識部位５をその活性な化学構造を保持しているにもかかわらず、イオンチャネル１に対する活性が非活性化されることになる。

なお、図２及び図３において、リンカーが充分に長い場合（例えば、後記化合物６の場合等）には当然のことながら、活性阻害はなく、本来の活性を示す。

【０００９】

次に、本発明を生理活性物質としてイモ貝より単離されたμ－コノトキシンにより、より具体的に説明する。ペプチド毒であるμ－コノトキシンは、ナトリウムチャネルのサイト１に作用する毒物として、テトロドトキシンやサキシトキシンなどと同種の毒物であることが知られている。

μ－コノトキシンのアミノ酸配列とその立体構造の概要を図４に示す。図４は、μ－コノトキシンＧＩＩＩＡを示し、このものは１位のアルギニンから２２位アラニンまでの２２個のアミノ酸からなるものである。３位のシステインと１５位のシステイン、４位のシステインと２０位のシステイン、及び１０位のシステインと２１位のシステインが、各々Ｓ－Ｓ結合により結合している。μ－コノトキシンＧＩＩＩＡの活性中心は１３位のアルギニン付近である。

【００１０】

μ－コノトキシンＧＩＩＩＡの各アミノ酸の生理活性に与える影響を各アミノ酸をアラニン又はリジンに代えることにより調べた結果を図５に示す。図５の縦軸摘出ラット横隔膜標本の電気刺激による収縮を５０％阻害する濃度（IC_{50}（ｌｏｇ（Ｍ））を示し、点線は天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡのIC_{50}を示している。図５の横軸は１位から２２位までのアミノ酸を示し、図５の黒塗りは該当部位のアミノ酸をアラニンに置換した場合のIC_{50}を示し、灰色は該当部位のアミノ酸をリジンに置換した場合のIC_{50}を示している。

図５によれば、例えば１３位のアルギニンをアラニンやリジンに代えるとIC_{50}が上昇し、即ち活性が無くなる、即ち１３位のアルギニンはμ－コノトキシンＧＩＩＩＡの生理活性に必須の部分を形成していると考えられる。

一方、５位のトレオニンや９位のリジンは、これをアラニンに代えてもIC_{50}に変化がみられず、これはこの部位はμ－コノトキシンＧＩＩＩＡの生理活性に影響を与えない部位であると考えられる。

【００１１】

本発明者らは、１３位の活性部位、即ち受容体認識部位の立体的にほぼ反対側に相当する５位のトレオニンに着目した。５位のトレオニンの部位は、立体的に受容体認識部位の背面に相当し、かつ生理活性に影響を与えない部分である。

本発明者らは、この５位のトレオニンの部位にリンカーを導入するために、官能基を有するアミノ酸で置換した。本実験においては、官能基を有するアミノ酸としてシステイン又はリジンを採用した。μ－コノトキシンＧＩＩＩＡは８位、９位などにリジンを有しており、このリジンのアミノ基との化学反応性を明確にするために、官能基を有するアミノ酸としては、メルカプト基を有するシステインが好ましい。

【００１２】

天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（μＧＩＩＩＡ）、５位のトレオニンをＳ－メチルベンジルシステインで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５）、及び５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）について、ラット骨格筋の収縮について試験をした。結果を図６に示す。図６は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図６の縦軸は骨格筋の張力（ｍＮ（ミリニュートン））を示し、黒い部分が大きいことはナトリウムイオンチャネルが正常な状態であって、骨格筋が十分な張力を有していることを示している。図６の横軸は時間（分）である。

図６の上段は、天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡを０．３μＭ添加したときの張力の推移を示している。μ－コノトキシンＧＩＩＩＡの添加により張力が急速に低下し、骨格筋に異常が生じていることを示している。張力が無くなった後、これを水洗（ｗａｓｈ）（図６中の白抜きの矢印）すると、添加されたμ－コノトキシンＧＩＩＩＡが洗い流され張力が回復してくることがわかる。このときの０．３μＭの阻害率は９９％であった。

【００１３】
図６の中段は、５位をＳ－メチルベンジルシステインで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５）を０．３μＭ添加し、さらに１μＭ添加したときをしめしている。張力が無くなることから、このものも天然のものと同様の生理活性を有していることがわかる。水洗（図６中の白抜きの矢印）により天然のものと同様に張力の回復が見られる。このときの０．３μＭの阻害率は４７％であった。
図６の下段は、５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）を０．３μＭ添加し、さらに１μＭ添加したときを示している。張力が無くなることから、このものも天然のものと同様の生理活性を有していることがわかる。水洗（図６中の白抜きの矢印）により天然のものと同様に張力の回復が見られる。このときの０．３μＭの阻害率は６２％であった。
【００１４】
このように生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を簡単な化学修飾してみても、当該生理活性物質の生理活性を非活性化することはできない。これはそもそも生理活性物質の受容体認識部位以外の部分はその生理活性に大きな寄与をしていないからである。
次に、本発明者らは、ビオチンに対して親和性を有しているアビジンを用いて、前記の５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）についての実験を行った。結果を図７に示す。図７は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図７の縦軸及び横軸は図６のそれと同様である。
図７のａ（図７最上段）は、Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５とアビジン（Ａｖ）を同時に添加した場合を示す。最初１μＭを添加したが骨格筋収縮の異常は観測できなかった。次いでその濃度を３μＭ、１０μＭと上げていってもμ－コノトキシンＧＩＩＩＡによる生理活性を観測することはできなかった。図６の下段に示される実験においてはＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５は０．３μＭで６２％の阻害率を示し、１μＭで天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡとほぼ同程度の阻害を示したが、これにアビジンを存在させることにより、１０μＭの濃度においても非活性化できることが分かった。
【００１５】
次に先にアビジン（Ａｖ）を１μＭ添加しておき、次いでＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５を１μＭ、３μＭと添加して行った場合の結果を図７のｂ（図７上から２段目）に示す。この結果、先にアビジンを添加しておいても、Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５の活性が発現しないことがわかった。図７のｂの右端、図７ｃの右端及び図のｄは比較のために天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡを添加した場合の結果を示している。図７のｂの右端の結果から、天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡの場合には、アビジンが存在していてもその生理活性に影響はほとんど無く、アビジンが存在しない場合とほぼ同程度の生理活性が発現することが分かる。
さらに、図７のｃ（図７の上から３段目）は、まずＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５を１μＭ添加した場合の結果を示す。Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５の添加による骨格筋の収縮の阻害が観察される。次いで、その系にアビジン０．５μＭ、１μＭを添加してゆくと、Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５による骨格筋収縮の阻害が徐々に無くなり、骨格筋収縮が正常化してくることがわかった。正常化したところに天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡを添加すると、骨格筋収縮の阻害がみられた（図７のｃの右端）。
【００１６】
以上の実験結果から、５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）は天然のものと同様な骨格筋収縮の阻害作用を有しているが、これにＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５の添加と同時、添加前、又は添加後にビオチンに親和性を有するアビジンを添加すると、その阻害活性が非活性化されることがわかった。
そして、μ－コノトキシンＧＩＩＩＡは、細胞のナトリウムチャネルのサイト１に作用することが知られており、これは当該チャネルの中程であることから、天然のものと同様な生理活性を有する５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）は化学修飾されていても、天然のものと同様にナトリウムチャネルの作用部位に結合して骨格筋収縮を阻害するが、これにアビジンを添加した場合には、Ｌｙ

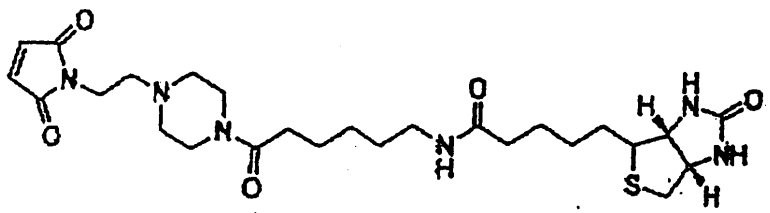
ｓ（Ｂｉｏｔ）５のビオチン部分がアビジンに優先的に結合し、もはやナトリウムチャネルに結合することができなくなったことを意味している。そして、アビジンは分子量約６万５千の巨大なタンパク質であり、ナトリウムチャネルのような小さなチャネルの中には侵入できない分子種であるから、丁度チャネルの外側から生理活性物質μ－コノトキシンGIIIAを化学修飾されたビオチンにより釣り上げたものと考えられる。

【００１７】

さらに、５位のトレオニンをシステインで置換したμ－コノトキシンGIIIA（Ｃｙｓ－５）のメルカプト基の部分に、次式（Ｉ）、

【００１８】

【化１】

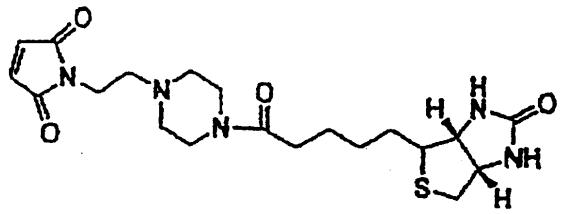


【００１９】

で示されるビオチン化ＰＥＡＣ５を結合させた非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）、及び、５位のトレオニンをシステインで置換したμ－コノトキシンGIIIA（Ｃｙｓ－５）のメルカプト基の部分に、次式（II）、

【００２０】

【化２】



【００２１】

で示されるビオチン化ＰＥを結合させた非活性化誘導体Ｂ（ビオチンＰＥマレイミド）を用いて同様の実験を行った。結果を図８に示す。図８は骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図８の縦軸及び横軸は図６のそれと同様である。

非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）は、少し長めのリンカーを用いた例であり、非活性化誘導体Ｂ（ビオチンＰＥマレイミド）は短めのリンカーを用いた例である。

図８のａ（図８の最上段）は、まず非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）を１μＭ添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン（Ａｖ）を１μＭ添加した場合を示している。アビジンの添加により徐々に収縮の阻害が緩和されてきているが、その程度は比較的弱い。図８のｂ（図８の上から２段目）は、非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）を１μＭとアビジンとを同時に添加した場合を示している。アビジンの存在にもかかわらず、骨格筋の収縮阻害活性が少しずつでてきているようすがわかる。

図８のｃ（図８の上から３段目）は、まず非活性化誘導体Ｂ（ビオチンＰＥマレイミド）を１μＭ、次いで３μＭ添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン（Ａｖ）を１μＭ添加した場合を示している。アビジンの添加により比較的早く緩和されてきているこ

とがわかる。

【００２２】

非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）に使用されているビオチン－リンカーでは、リンカー部の長さが比較的長くビオチンがチャネルの入口付近にまで達していることにより、アビジンを添加しても釣り上げられる距離が少なく、生理活性物質とチャネルとの解離が充分に行えない結果、アビジンの添加によっても急速な骨格筋収縮の回復が観測できなかったと考えられる。

一方、非活性化誘導体Ｂ（ビオチンＰＥマレイミド）の場合には、リンカー部の長さが比較的短く、アビジンの添加により大きく釣り上げられ、その結果図７に示した場合と同様に急速な骨格筋収縮の回復が観測できたと考えられる。

【００２３】

これらの実験の結果は、先程の図３に示される状態であると考えられる。即ち、生理活性物質であるμ－コノトキシンGIIIA（図３の（４））のリンカー（６）を介してビオチン（８）が結合されている。そして、アビジン（７）が無い場合にはμ－コノトキシンGIIIA（４）の受容体認識部位（５）とナトリウムチャネル（１）の作用部位（３）が結合しており、ナトリウムイオンの細胞内への流入が阻害され、その結果骨格筋の収縮が阻害されることになる。本発明の化学修飾は受容体認識部位以外の部分においておこなわれることを特徴とするものであるから、本発明の化学修飾が行われてもその生理活性に大きな影響が無いのは当然のことである。このことは、図６の下段に示す実験や、図７のｃの前半の実験の結果からも明らかである。

この系にアビジン（７）が存在してくると、アビジン（７）は分子が大きいのでチャネル（１）の内部には侵入することができなくて、図３に示されるようにチャネル（１）の外側に存在することになる。そして、ビオチン（８）とアビジン（７）の親和性によりビオチン部分を有するＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５全体がアビジン（７）に釣り上げられたような格好になる。その結果、チャネル（１）と生理活性物質（４）との結合が解かれ、チャネル（１）は正常な作用をすることができるようになる。

【００２４】

さらに、このことは、ビオチンとリンカーの長さが、チャネルの入口から作用部位までの距離よりも短いことを示している。なぜならば、仮にリンカーとビオチンの長さがチャネルの入口から作用部位の距離よりも長いのであるならば、ビオチンはチャネルの外側にでることができ、アビジンとの結合においては生理活性物質を動かすことなくチャネルの外側で自由にできるからである。その結果、アビジンとビオチンが結合しても生理活性に影響は生じないことになるからである。

このことは、リンカーの長さを変えてその生理活性を測定することにより、生理活性に変化が生じないリンカーの最少の長さが、受容体の入口と作用部位の距離であるということを示している。したがって、この方法により、受容体において生理活性物質が作用している部位と当該受容体の入口の距離を、本発明の非活性化誘導体のリンカーの長さにより測定することができる。

【００２５】

また、Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５全体がアビジンに釣り上げられるということは、アビジンが受容体の中に侵入できない大きさであることを示している。なぜならば、仮にアビジンが受容体の中に侵入できる大きさであったならば、ビオチンと結合するためにアビジンのほうが受容体内に入り込み、生理活性物質と受容体との結合に変更が生じない結果、生理活性にも影響が生じないことになるからである。

このことは、本発明の非活性化誘導体における受容体に侵入することができない物質として、大きさの分かっている種々の物質を用いて生理活性物質の生理活性を測定することにより、当該生理活性に変更が生じる大きさの物質が、当該受容体の入口の大きさにほぼ匹敵するということになる。したがって、この方法により目的の受容体の入口の大きさを測定することができることになる。

【００２６】

さらに、受容体の作用部位に生理活性物質が結合していたものが、ビオチンとアビジンとの親和力により解離させられるということから、受容体と生理活性物質との結合力よりもビオチンとアビジンの親和力のほうが大きいことがわかる。このことは、本発明の「受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質」と「受容体に侵入することができない物質」との組み合わせをその親和力が既知の種々のものに変更することにより、受容体と生理活性物質との結合力を測定することができることを示している。したがって、本発明のこの方法により受容体と生理活性物質との結合力を測定することが可能となる。

【００２７】

【発明の実施の形態】

本発明は、受容体の内部に入ってその生理活性を発現する生理活性物質における、化学修飾に関するものであるが、当該化学修飾を生理活性部位ではなく、生理的に非活性の部分から行うことを特徴とするものである。特に、生理活性中心の立体的な背面に相当する部分の生理的に非活性な箇所を化学修飾することを特徴とし、かつその部分に釣り糸の如きリンカーを結合し、更に当該リンカーの他端に当該受容体に侵入することができない物質又は当該受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質を結合させることを特徴とするものである。

本発明は、このような化学修飾を行うことにより、生理活性中心をそのままの形で保存しながらも、生理的に非活性にすることができることを見出したものである。しかも、このような化学修飾により、生理活性物質の受容体に対する親和力と、立体的な障害や化学修飾部分の親和力との関係を測定することができる新規なツールを提供するものである。

【００２８】

本発明の受容体としては、いわゆる受容体に限定されるものではなく、レセプター（受容体）、イオンチャネル、トランスポーター、ポンプなどの孔を形成するものであればよい。ナトリウムチャネル、カルシウムチャネル、アミノ酸トランスポーター、セレトニントランスポーターなどのイオンチャネルやトランスポーターなどは、細胞膜を貫通する孔を有しており本発明の受容体として好ましいものである。

本発明の生理活性物質としては、前記受容体の内部に入ってその生理活性を発現するもので、生理活性中心の背面に化学修飾ができる部位を有するものであればよい。分子量が余り小さいと化学修飾可能な部分が無いので好ましくない。受容体の内部にすっぽりと入ってゆけて、かつ生理的に非活性な部分を有するものであればよい。

本発明の生理活性物質は、前記受容体の中に入って作用して細胞に生理的な影響を与えるものであればよく、生理的作用を亢進するものであってもよいし、阻害するものであってもよい。生体内生理活性物質であってもよいし、医薬品のような物質であってもよいし、毒物となる物質であってもよい。また、タンパク質性の物質であっても、非タンパク質性の物質であってもよい。

【００２９】

本発明のリンカーとしては、分子の一端に生理活性物質又は化学修飾された生理活性物質と化学結合し得る官能基を有し、他端に「受容体に侵入することができない物質」又は「受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質」と化学結合し得る官能基を有するものであって、両端の官能基の間に生理的に非活性の部分を有する化合物が好ましい。例えば、前記した一般式（Ｉ）や一般式（II）で示されるもの、或いは後記実施例５及び実施例６で得られた化合物に含まれるリンカー等が好ましいものとして挙げられる。

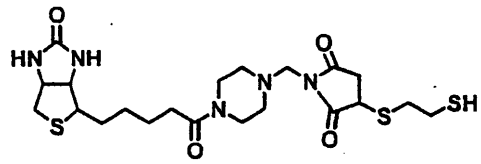
両端の官能基の間の部分としては、非活性化誘導体の場合には、例えば炭素数１～３０、また、生理活性が保持された誘導体の場合には、例えば炭素数２０～５０の鎖状基を有する基が挙げられる。なお、当該鎖状のなかの炭素原子の一部又は全部が酸素原子、窒素原子、イオウ原子などの異種原子によって置換されていてもよく、また、当該鎖状のなかに環を有していてもよい。このような環としては、炭素環であってもよいし、酸素原子、窒素原子、イオウ原子などの異種原子を有する複素環であってもよい。

【００３０】

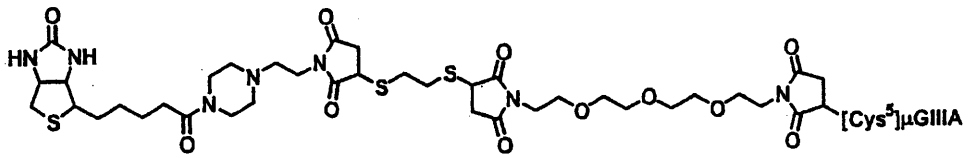
本発明の受容体に侵入することができない物質としては、受容体の入口の大きさよりも大

きな分子で受容体の内部に侵入でないものであればよい。当該物質がリンカーに直接結合する場合には、前記リンカー分子に化学結合し得る官能基を有する分子である。また、当該物質がリンカーに直接結合しない場合には、リンカーに直接結合する物質と親和性がある物質である。
当該物質は必要に応じて、放射性元素や蛍光物質などで標識化することもできる。
【００３１】
本発明の受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質としては、前記した「受容体に侵入することができない物質」と親和性を有し、リンカーに化学結合し得る官能基を有するものが好ましい。親和性としては特に制限はないが、化学親和力でも物理的な親和力であってもよいが、当該親和力を細胞系と同様な環境下で測定可能なものが好ましい。
【００３２】
本発明の生理活性物質の非活性化誘導体は、生理活性部分を天然物と同じ形態で保持して、しかも生理的に非活性化されたものであることから、特に毒物の無毒化抗原として有用なものである。
本発明の抗体を製造する方法としては、通常の抗体の製造方法に従って製造することができる。生理活性物質が毒物であっても、本発明の非活性化誘導体は無毒化されていることから、そのまま感作動物に投与することができる。
本発明の生理活性物質の非活性化誘導体をラット、マウスなどの動物に投与して、感作し、抗体を含有する細胞を取り出し、これを常法にしたがって抗体を製造することができる。例えば、細胞融合法や抗体の遺伝子をクローニングしてキメラ抗体やヒト化抗体とするなどの方法を採用することができる。
【００３３】
一方、本発明において、生理活性物質の受容体認識部位以外の部分を化学修飾して、当該化学修飾部位にリンカーを結合し、当該リンカーの他端を担体に固定する場合の担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラスビーズ、シリカゲル、多糖類（誘導体を含む）等が挙げられる。
また、リンカーの他端に結合させた物質と親和性を有する物質としては、例えばアビジン等が挙げられる。なお、アビジンはそれ自体を担体とすることも可能である。アビジンを担体とした場合、若しくはアビジンを担体に固定させた場合には、リンカーの他端に結合させる物質はビオチンとなる。
リンカーが充分に長い本発明化合物（例えば、後記化合物６等）は、例えばこれをアビジンカラムと使用することにより、新しいナトリウムチャネルやカルシウムチャネルを単離することが可能となる。また、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物（ビオチンアナローグ）をアビジンと複合させて分子量を大きくさせると、感度が上がり、例えば極低温電子顕微鏡等を用いて、ナトリルムチャネル上での結合部位を明らかにすることが出来る（毒そのものでは、分子が小さすぎて電子顕微鏡などで観察しにくい。）。
従って、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物は、生物学的にも利用価値の高いアナローグと言うことが出来る。
【００３４】
【実施例】
次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。
【００３５】
実施例１　Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５－μ－コノトキシンの製造
脱離が可能な保護基を有するアミノ酸、Arg（Pmc）、Asp（OtBu）、Cys（Trt）、Gln（Trt）、Lys（Boc）、Ser（t-Bu）、Thr（tBu）、Hyp（tBu）ならびにMeBzlCysを有する保護ペプチドをＦＭＯＣ法を用いた固相合成によって調製した。保護ペプチドは、樹脂をＴＦＡ－チオアニソール－H_2O－フェノール－ＥＤＴによって氷冷下５分間、室温１．５時間攪拌することによって樹脂からはずし、エーテルで樹脂とともに沈殿させ、濾過後、２

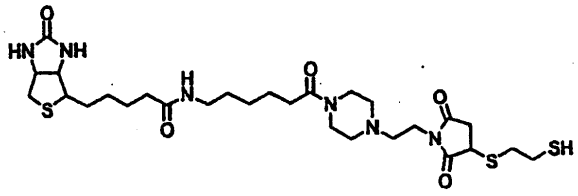
M酢酸で溶出した。樹脂を水で洗浄し、この洗液を先の酢酸溶液に加え、アンモニア水にてｐＨを７．８とした。この粗ペプチド（０．５ｍＭ，Ｏ．２Ｍ酢酸アンモニウム溶液）を１－２日間攪拌し、空気酸化した。凍結乾燥後、３０％酢酸によるセファデックスＧ－５０Ｆカラム、ＣＭ－セルロースＣＭ－５２によるイオン交換（酢酸アンモニウム０．０１Ｍ～０．７Ｍ）クロマト、ならびにＯＤＳ－ＨＰＬＣ（０．１％ＴＦＡ－アセトニトリル）によって精製し、収率４．７％で合成した。
結果のＨＰＬＣならびにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスを図９に示す。
【００３６】
実施例２　Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５－μ－コノトキシン（化合物２）の製造
脱離が可能な保護基を有するアミノ酸、Arg（Pmc）、Asp（OtBu）、Cys（Trt）、Gln（Trt）、Lys（Boc）、Ser（t-Bu）、Thr（tBu）、Hyp（tBu）、ならびにLys（Biot）を使い、５位にLys（Biot）を有する保護ペプチドをＦＭＯＣ法を用いた固相合成機によって調製した。保護ペプチドは、樹脂をＴＦＡ－チオアニソール－H_2O－フェノール－ＥＤＴによって氷冷下５分間、室温１．５時間攪拌することによって樹脂からはずし、エーテルで樹脂とともに沈殿させ、濾過後、２Ｍ酢酸で溶出した。樹脂を水で洗浄し、この洗液を先の酢酸溶液に加え、アンモニア水にてｐＨを７．８とした。この粗ペプチド（０．５ｍＭ，０．２Ｍ酢酸アンモニウム溶液）を１－２日間攪拌し、空気酸化した。凍結乾燥後、３０％酢酸によるセファデックスＧ－５０Ｆカラム。ＣＭ－セルロースＣＭ－５２によるイオン交換（酢酸アンモニウム０．０１Ｍ～０．７Ｍ）クロマト、ならびにＯＤＳ－ＨＰＬＣ（０．１％ＴＦＡ－アセトニトリル）によって精製し、収率６．０％で合成した。
結果のＨＰＬＣならびにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスを図１０に示す。
【００３７】
実施例３　Ｓ－ビオチンＰＥＡＣ５システイン－５－μ－コノトキシン（化合物３）の製造
（１）［Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５］－μ－コノトキシンをＨＦに溶解し０℃にて１時間反応した。ＨＦを除去後、水に溶解してエーテルにて洗浄し、凍結乾燥した。生成物をＯＤＳ－ＨＰＬＣ（０．１％ＴＦＡ－９％アセトニトリル）にて精製し、［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンを６５％の収率で合成した。
結果のＨＰＬＣならびにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスを図１１に示す。
（２）［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンを０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液中、ビオチンＰＥＡＣ５マレイミドと３０秒間反応させ、セファデックスＧ２５Ｆによるゲル濾過（０．０２Ｍ酢酸アンモニウム）にて精製し、凍結乾燥した。
結果のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスを図１２に示す。
【００３８】
実施例４　Ｓ－ビオチンＰＥ５システイン－５－μ－コノトキシン（化合物４）の製造
［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンを０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液中ビオチンＰＥマレイミドと３０秒間反応させ、セファデックスＧ２５Ｆによるゲル濾過（０．０２Ｍ酢酸アンモニウム）にて精製し、凍結乾燥した。
結果のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスを図１３に示す。
【００３９】
実施例５　ＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物５）の製造
（１）ビオチンＰＥマレイミド（３．４ｍｇ）を０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０、１ｍｌ）に溶解し、エタンジチオール（２０μｌ）を含有する０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０、５００μｌ）中に滴下し、３０分攪拌した。反応後、ジエチルエーテル（１ｍｌ×５）でエタンジチオールを除き、凍結乾燥した。これをＲＰ－ＨＰＬＣで精製した後、再度凍結乾燥して、下式
【００４０】
【化３】



【００４１】
で示される化合物（ＰＥ－ＥＤＴ）を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図１４に示す。
（２）５ｍＭのＢＭ（ＰＥＯ）$_4$（２０μｌ）を含有する０．０２Ｍ酢酸アンモニウム（ｐＨ４．０）溶液に、［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（０．１μｍｏｌ）を０．０２ＭアンモニウムｐＨ４．０（３０μｌ）に溶解した溶液を加え、１０分間撹拌した。これに６ｍＭの上記（１）で得られた化合物（５０μｌ）を加え、３０分間撹拌した。この溶液をそのままＲＰ－ＨＰＬＣで精製し、凍結乾燥して、下式
【００４２】
【化４】

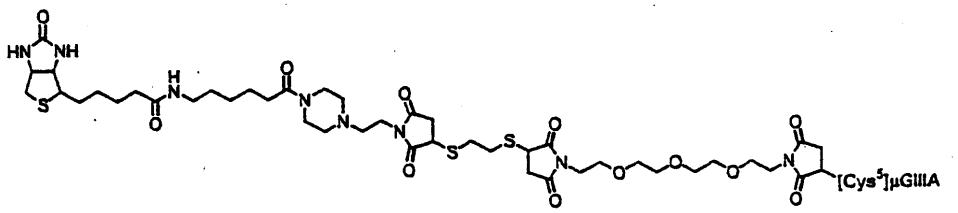


【００４３】
で示される化合物を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図１５に示す。
【００４４】
実施例６　ＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物６）の製造
（１）ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド（４．２ｍｇ）を０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０、１ｍｌ）に溶解し、エタンジチオール(２０μｌ）を含有する０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０、５００μｌ）に滴下し、３０分間撹拌した。反応後、ジエチルエーテル(lml×５）でエタンジチオールを除き、凍結乾燥した。これをＲＰ－ＨＰＬＣで精製した後、再度凍結乾燥して、下式
【００４５】
【化５】



【００４６】
で示される化合物（ＰＥＡＣ－ＥＤＴ）を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図１６に示す。
（２）５ｍＭのＢＭ（ＰＥＯ）$_4$（２０μｌ）を含有する０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０）に、［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（０．１μｍｏｌ）を０．０２Ｍ酢酸アンモニウム溶液（ｐＨ４．０、３０μｌ）に溶かした溶液を加え、１０分間撹拌した。

これに６ｍＭの上記（１）で得た化合物(５０μｌ）を加え、３０分間撹拌した。
この溶液をそのままＲＰ－ＨＰＬＣで精製し、凍結乾燥して、下式
【００４７】
【化６】



【００４８】
で示される化合物を得た。得られた化合物の質量スペクトルチャートを図１７に示す。
【００４９】
また、図１８に、化合物５及び化合物６について行った骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真を示す。図１８の縦軸及び横軸は図６のそれと同様である。
図１８の最上段は、まずＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物５）を１μＭ、次いで３μＭ添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン（Ａｖ）を３μＭ添加した場合を示している。アビジンの添加により収縮の阻害が緩和されている。図１８の上から２段目は、まずＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物５）を１μＭ、次いで３μＭ添加し、次いでストレプトアビジン（ＳｔＡｖ）を３μＭ添加した場合を示している。アビジンの場合と同様ストレプトアビジンの添加により収縮の阻害が緩和されていることが判る。図１８の上から３段目は、まずＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物６）を１μＭ、次いで３μＭ添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにストレプトアビジン（ＳｔＡｖ）を３μＭ添加した場合を示している。この場合も最上段及び２段目と同様、ストレプトアビジンの添加により収縮の阻害が緩和されている。図１８の最下段は、ＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物６）を１μＭ添加し、骨格筋の収縮が阻害されたときにアビジン（Ａｖ）を１μＭ添加した場合を示しているが、この場合にはアビジンを添加しても収縮の阻害が緩和されない、即ち、μ－コノトキシンの骨格筋収縮に対する阻害活性がそのまま保持されていることが判る。
【００５０】
試験例１　ラット骨格筋の収縮試験
ラットの横隔膜を摘出後、適当な大きさに裁断してリンガー液中に懸垂する。この筋標本の電気刺激によって生じる張力を電気的に測定した。サンプルを水に溶解し、この標本に加えその際生じる張力の減少を測定した。また、リンガー液を代えることあるいはさらに薬物を添加することによって薬物の影響からの回復する過程を記録した。
【００５１】
試験例２　骨格筋収縮に対する阻害活性（IC_{50}）の測定
天然のμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ、５位のトレオニンをシステインで置換したμ－コノトキシンＧＩＩＩＡ及びμ－コノトキシンＧＩＩＩＡの各種ビオチンアナローグについて、電気刺激に対する骨格筋収縮における阻害活性の程度を測定した。結果を表１に示す。
【００５２】
【表１】

化合物	阻害活性	IC_{50}（アナローグ）
	IC_{50}, μM	IC_{50}（天然の GIIIA）
天然の GIIIA	０．１０	１
[Cys5]GIIIA	１．９	１９
化合物２	０．５９	５．９
＋Ａｖ	＞３．０	＞３０
化合物４	２．１８	２１．８
＋Ａｖ	＞３．０	＞３０
化合物３	１．００	１０．０
＋Ａｖ	＞３．０	＞３０
＋ＳｔＡｖ	＞３．０	＞３０
化合物５	２．１４	２１．４
＋Ａｖ	＞３．０	＞３０
＋ＳｔＡｖ	＞３．０	＞３０
化合物６	１．１１	１１．１
＋Ａｖ	１．６４	１６．４
＋ＳｔＡｖ	＞３．０	＞３０

[Cys5]GIIIA：５位のトレオニンをシステインで置換したμ－コノトキシン GIIIA

Ａｖ：アビジン、　ＳｔＡｖ：ストレプトアビジン

【００５３】

【発明の効果】

本発明は、生理活性物質の生理的に非活性な部分、好ましくは生理活性部分の立体的に裏側の部分を化学修飾し、これにリンカー部及び立体的に大きな分子を結合させることにより、生理活性部分をそのまま保持した生理的に非活性な誘導体と、生理活性を保持したままの誘導体とを提供するものである。また、本発明は生理活性物質の新規な非活性化方法と、生理活性物質の非活性化誘導体に対する抗体を提供するものである。

本発明の非活性化誘導体は生理活性中心がそのまま保持されていることから、毒物であっても抗体の製造が容易となるばかりでなく、当該生理活性物質の受容体の構造解析をするための新規な方法をも提供するものである。

また、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物を用いることにより、新しいナトリウムチャネルやカルシウムチャネルの単離も可能である。

更に、リンカーが長く、活性を保持したままの本発明化合物を用いることにより、例えば極低温電子顕微鏡等を用いて、ナトリルムチャネル上での結合部位を明らかにすることが

出来る

【図面の簡単な説明】

【図１】図１は、生理活性物質と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図２】図２は、本発明の非活性化誘導体と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図３】図３は、本発明の別の態様の非活性化誘導体と受容体との関係を模式的に示したものである。

【図４】図４は、μ－コノトキシンGIIIAのアミノ酸配列及びその立体構造を模式的に示したものである。

【図５】図５は、μ－コノトキシンGIIIAの各位のアミノ酸をアラニン又はリジンに置換した場合のＩＣ$_{50}$をグラフ化したものである。黒塗りはアラニンに置換した場合を、灰色はリジンに置換した場合を、ＮＴは試験していない場合を示す。

【図６】図６は、μ－コノトキシンGIIIA（μGIIIA）（図６の上段）、５位のトレオニンをＳ－メチルベンジルシステインで置換したμ－コノトキシンGIIIA（Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５）（図６の中段）、及び５位をＮ－ビオチン化リジンで置換したμ－コノトキシンGIIIA（Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５）（図６の下段）について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図６の縦軸は骨格筋の張力（ｍＮ（ミリニュートン））を示し、図６の横軸は時間（分）である。

【図７】図７は、Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５とアビジン（Ａｖ）を同時に添加した場合（図７最上段）、先にアビジン（Ａｖ）を添加し、次いでＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５を添加した場合（図７上から２段目）、まずＬｙｓ（Ｂｉｏｔ）５を添加し、次いで、その系にアビジンを添加した場合（図７の上から３段目）、μ－コノトキシンGIIIA（μGIIIA）のみの場合（図７の最下段）について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図７の縦軸は骨格筋の張力（ｍＮ（ミリニュートン））を示し、図７の横軸は時間（分）である。

【図８】図８は、まず非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）を添加し、次いでアビジン（Ａｖ）を添加した場合（図８の最上段）、非活性化誘導体Ａ（ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド）とアビジンとを同時に添加した場合（図８の上から２段目）、及び非活性化誘導体Ｂ（ビオチンＰＥマレイミド）を添加し、次いでアビジン（Ａｖ）を添加した場合（図８の上から３段目）について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図８の縦軸は骨格筋の張力（ｍＮ（ミリニュートン））を示し、図８の横軸は時間（分）である。

【図９】図９は、［Ｃｙｓ（ＭｅＢｚｌ）５］－μ－コノトキシンのＨＰＬＣ（左）とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマス（右）のチャートを示す。

【図１０】図１０は、［Ｌｙｓ（Ｂｉｏｔ）５］－μ－コノトキシンのＨＰＬＣ（左）とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマス（右）のチャートを示す。

【図１１】図１１は、［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンのＨＰＬＣ（左）とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマス（右）のチャートを示す。

【図１２】図１２は、ビオチンＰＥＡＣ５マレイミド化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスのチャートを示す。

【図１３】図１３は、ビオチンＰＥマレイミド［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦマスのチャートを示す。

【図１４】図１４は、ＰＥ－ＥＤＴの質量スペクトルチャートを示す。

【図１５】図１５は、ＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンの質量スペクトルチャートを示す。

【図１６】図１６は、ＰＥＡＣ－ＥＤＴの質量スペクトルチャートを示す。

【図１７】図１７は、ＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシンの質量スペクトルチャートを示す。

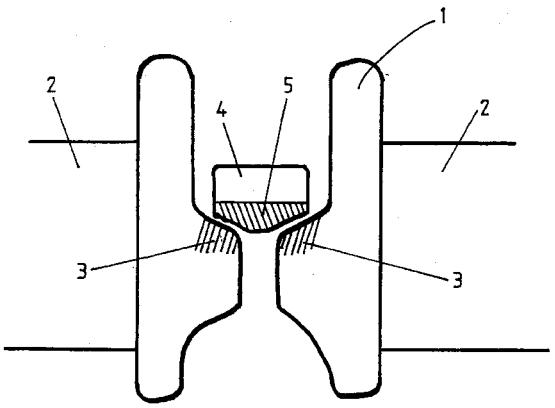
【図１８】図１８は、まずＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物５）を添加し、次いでアビジン（Ａｖ）を添加した場合（図１８の最上段

）、まずＰＥ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物５）を添加し、次いでストレプトアビジン（ＳｔＡｖ）を添加した場合（図１８の上から２段目）、まずＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物６）を添加し、次いでストレプトアビジン（ＳｔＡｖ）アビジン（Ａｖ）を添加した場合（図１８の上から３段目）、及び、まずＰＥＡＣ－ＥＤＴ－ＢＭ（ＰＥＯ）$_4$化［Ｃｙｓ５］－μ－コノトキシン（化合物６）を添加し、次いでアビジン（Ａｖ）を添加した場合（図１８の最下段）について、ラット骨格筋の骨格筋収縮実験の結果を示す図面に代わる写真である。図８の縦軸は骨格筋の張力（ｍＮ（ミリニュートン））を示し、図８の横軸は時間（分）である。

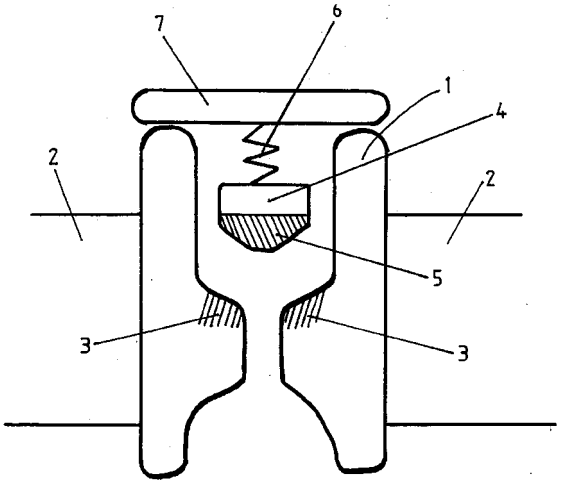
【符号の説明】

1　受容体
2　細胞膜
3　受容体の作用部位
4　生理活性物質
5　生理活性物質の受容体認識部位
6　リンカー
7　受容体に侵入することができない物質
8　受容体に侵入することができない物質と親和性を有する物質

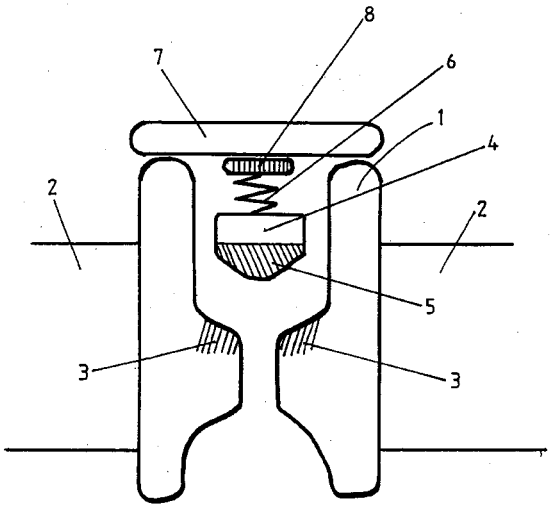
【図１】



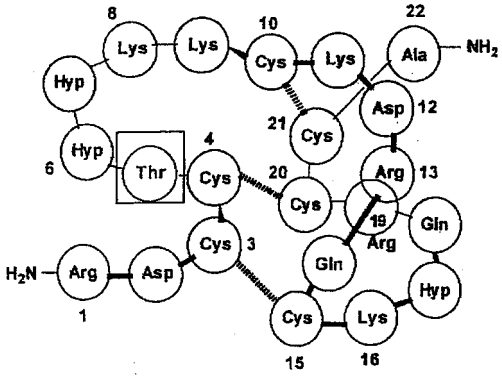
【図２】



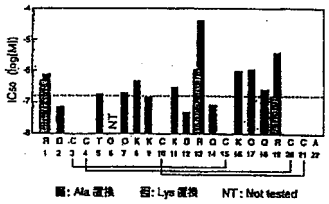
【図３】



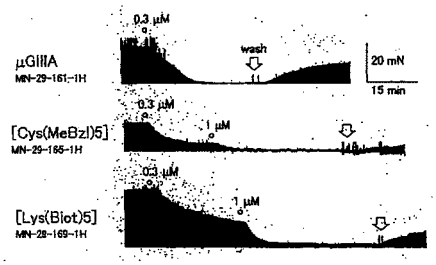
【図４】



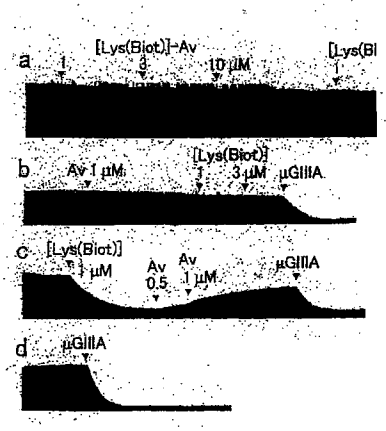
【図５】



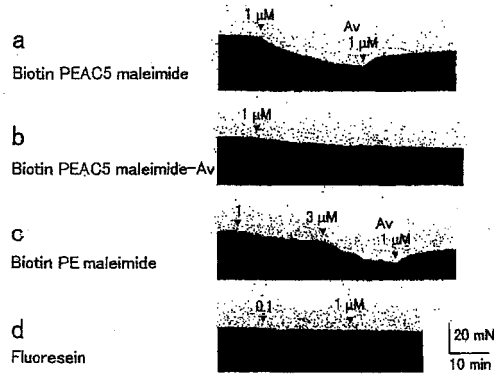
【図６】



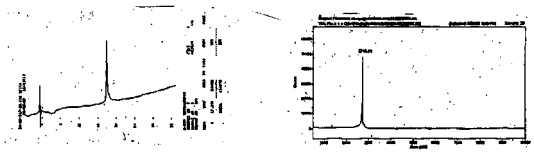
【図７】



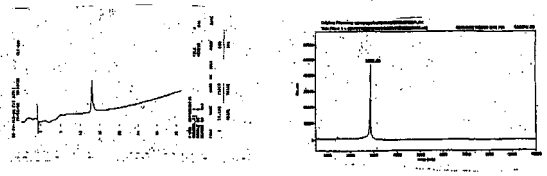
【図８】



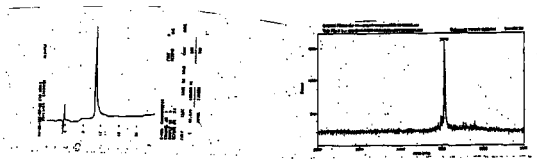
【図９】



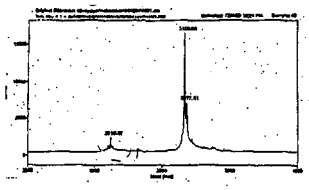
【図１０】



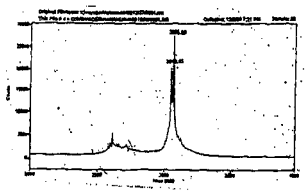
【図１１】



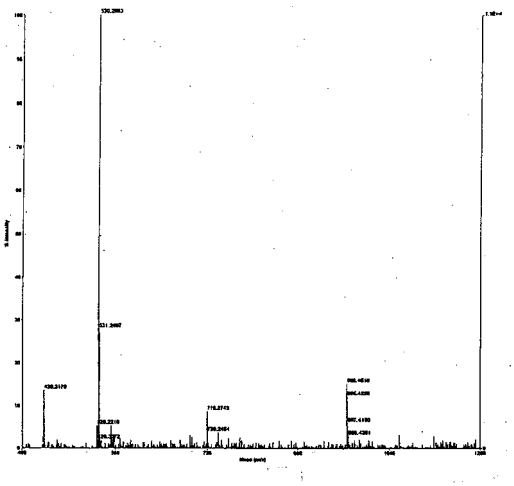
【図１２】



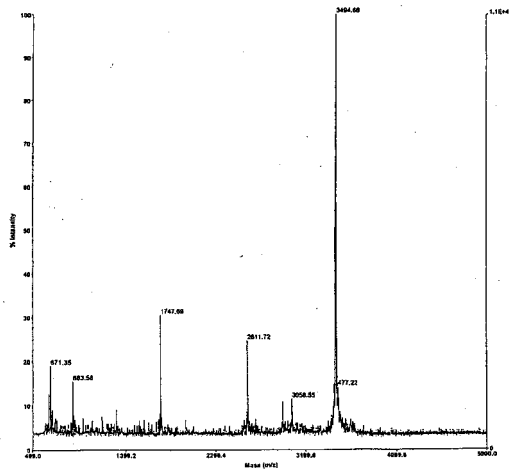
【図１３】



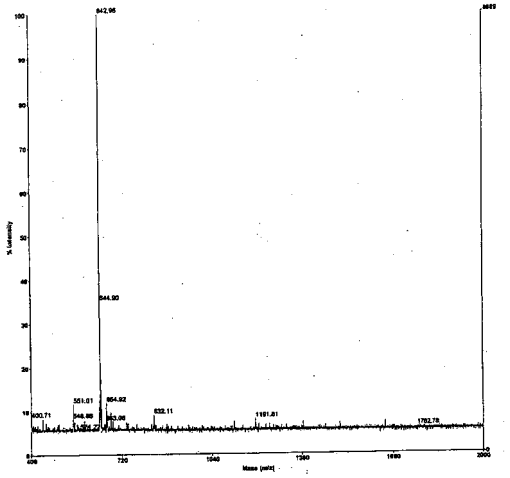
【図１４】



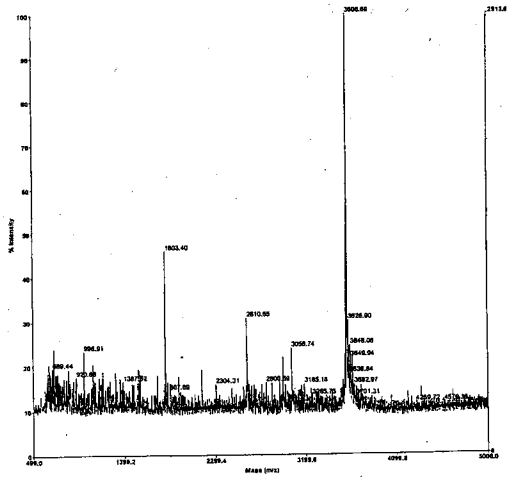
【図１５】



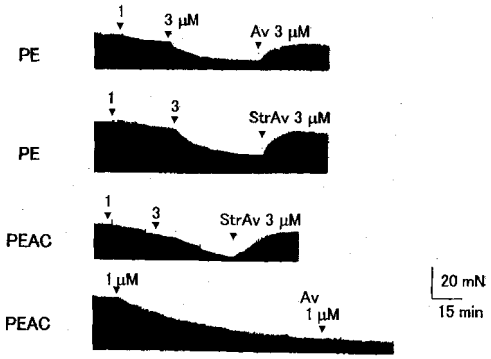
【図１６】



【図１７】



【図１８】


1
3 μM
Av 3 μM
PE
1
3
StrAv 3 μM
PE
1
3
StrAv 3 μM
PEAC
1 μM
Av
1 μM
PEAC
20 mN
15 min

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
G01N	***33/566***	***(2006.01)***	G01N	33/566	
G01N	***33/68***	***(2006.01)***	G01N	33/68	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
A61P	*39/02*	*(2006.01)*	A61P	39/02	

審査官　吉田　知美

(56)参考文献　Biochim. Biophys. Acta, １９８３年, 761, p.257-261
Ann. N. Y. Acad. Sci., １９９２年, 657, p.452-454
J. Immunol. Methods, １９９５年, 184, p.101-112
J. Immunol. Methods, １９９６年, 199, p.87-99
Pept. Chem., １９９２年, 1991, p.49-52
日本化学会講演予稿集, ２０００年　3月１５日, 78th [2], p.849, 2 E5 11
J. Immunol. Methods, １９９３年, 165, p.177-182
Bioorg. Med. Chem., １９９９年, 7, p.1181-1194

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 14/00-14/825
C07K 16/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)