

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4588978号
(P4588978)

(45) 発行日 平成22年12月1日(2010.12.1)

(24) 登録日 平成22年9月17日(2010.9.17)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K	17/02	(2006.01)	C O 7 K	17/02	Z N A
C O 7 K	17/14	(2006.01)	C O 7 K	17/14	
C 1 2 Q	1/25	(2006.01)	C 1 2 Q	1/25	
C 1 2 Q	1/26	(2006.01)	C 1 2 Q	1/26	
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34	

請求項の数 25 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-582270 (P2002-582270)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月17日(2002.4.17)
 (65) 公表番号 特表2004-534748 (P2004-534748A)
 (43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/004265
 (87) 国際公開番号 W02002/083933
 (87) 国際公開日 平成14年10月24日(2002.10.24)
 審査請求日 平成17年3月15日(2005.3.15)
 (31) 優先権主張番号 101 18 774.2
 (32) 優先日 平成13年4月17日(2001.4.17)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 509200093
 ジェイビーティー ペプチド テクノロジ
 ーズ ゲーエムペーハー
 ドイツ国 ベルリン フォルマーシュトラ
 ッセ 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素活性の基質特異性の決定方法およびそのデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

支持材の無孔平面上に複数のペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質を含み、該ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が方向性をもって固定されたアセンブリを得る工程と、

酵素をアセンブリと接触および/またはインキュベートする工程と、

アセンブリ上に固定された1つまたは複数のペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質と酵素との間の反応を検出する工程とを含み、

酵素とアセンブリとの反応中に少なくとも1つのペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質の分子量が変化することを特徴とする、酵素の基質特異性の決定方法。

10

【請求項 2】

支持材の表面上に固定したペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質上でまたは該ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質を使用して反応を検出することを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

1つのペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質上、酵素と反応するペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質上の共有結合の形成または切断により分子量が変化することを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

分子量の変化を検出することによって反応を検出することを特徴とする、請求項1~3の

20

いずれか一項記載の方法。

【請求項5】

オートラジオグラフィー、プラズモン共鳴分光法、および蛍光分光法を含む群より選択される検出方法によって反応を検出することを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

少なくとも1つのペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が酵素の基質であることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質のアセンブリが少なくとも2つの異なる酵素の各々に対する少なくとも1つの基質を有することを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項8】

酵素が、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、リアーゼ、およびリガーゼを含む群、または、キナーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、パルミチルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、スルファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、アセチラーゼ、およびプロテアーゼを含む群より選択されることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

アセンブリ上に固定されたペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質と酵素との間の反応の検出を、時間的間隔をおいて何度も繰り返すことを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項10】

酵素活性をサンプル中で決定し、サンプルは、尿、液、痰、糞便、リンパ液、他の体液、細胞溶解物、組織溶解物、器官溶解物、抽出物、未処理抽出物、精製調製物、および非精製調製物を含む群より選択されることを特徴とする、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

支持材がガラスであることを特徴とする、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項12】

ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が表面上の硫黄含有基を介して固定されていることを特徴とする、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

表面上の複数のペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質のアセンブリであって、該ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が支持材の無孔平面上に方向性をもって固定されており、少なくとも1つのペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が酵素の基質であり、酵素活性の結果として基質上で分子量が変化することを特徴とする、アセンブリ。

【請求項14】

分子量の変化が、基質上の共有結合の形成または切断の結果として起こることを特徴とする、請求項13記載のアセンブリ。

40

【請求項15】

ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質のアセンブリが少なくとも2つの異なる酵素の各々に対する少なくとも1つの基質を有することを特徴とする、請求項13または14記載のアセンブリ。

【請求項16】

支持材が、ケイ酸塩、セラミック、ガラス、金属、および有機支持材を含む群より選択されることを特徴とする、請求項13～15のいずれか一項記載のアセンブリ。

【請求項17】

50

ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質、ならびにこれらの各誘導体を含む群より選択されることを特徴とする、請求項13～16のいずれか一項記載のアセンブリ。

【請求項18】

各ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質またはペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質群が、別のペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質またはペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質群に関して定義された配置を有することを特徴とする、請求項13～17のいずれか一項記載のアセンブリ。

【請求項19】

請求項13～18のいずれか一項記載のアセンブリを含む支持体。

10

【請求項20】

ベース支持材を含むことを特徴とする、請求項19記載の支持体。

【請求項21】

複数のペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質のアセンブリが、1つまたは複数の支持体表面上に配置されていることを特徴とする、請求項19または20記載の支持体。

【請求項22】

2つの支持体がそれぞれギャップによって分離されている、請求項19～21のいずれか一項記載の少なくとも2つの支持体を含む支持体アセンブリ。

【請求項23】

第1の支持体上の少なくとも1つのアセンブリが第2の支持体上の少なくとも1つのアセンブリに対面していることを特徴とする、請求項22記載の支持体アセンブリ。

20

【請求項24】

ギャップの幅が0.01mm～10mm、0.1mm～2mm、または0.5mm～1mmであることを特徴とする、請求項22または23記載の支持体アセンブリ。

【請求項25】

請求項1～12のいずれか一項記載の方法における、請求項13～18のいずれか一項記載のアセンブリ、および/または請求項19～21のいずれか一項記載の支持体、および/または請求項22～24のいずれか一項記載の支持体アセンブリの使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

30

【0001】

本発明は、表面上の複数のアミノ酸配列のアセンブリ、これらを含む支持体および支持体アセンブリ、このようなアセンブリの製造方法、酵素活性の基質特異性の決定方法、ならびにサンプルの酵素活性パターンの決定方法の使用に関する。

【0002】

種々のゲノム計画からの配列情報数が増加するにつれて、支持材上に高密度の核酸フラグメントを含むアセンブリ（いわゆる、チップまたはバイオチップ）の重要性が大きくなっているが、これらのアセンブリのみが、より新規の合成技術および小型化に利用することができ、その結果多くに適用されている。核酸に加えて、天然物質またはそのライブラリだけでなく、オリゴペプチドおよびタンパク質のアセンブリもまた、このようなチップに適用されている。セルロース、ガラス、ニトロセルロース、PTFEメンブレン、および特殊寒天がこれらのアセンブリ用の支持材として使用されている。

40

【0003】

プロテオミクスおよびその生物学への適用が重要になるにつれ、ペプチドおよびタンパク質が興味を中心となりつつある。一般に、興味を中心は細胞の内外のほとんど全ての生化学反応を可能にするタンパク質および主にその酵素活性である。細胞内で特異的に活性な遺伝子によって産生される伝令RNA（mRNA）またはこのmRNAのDNAコピーのいずれかが検出される核酸アセンブリの使用は確かに非常に重要であるが、これらから得られる情報は多くの理由から細胞内および細胞外プロセスに関連するプロセスの理解および種々の生物学への適用における使用のためには十分ではない。これに関する1つの理由は、細胞

50

内のmRNA量が対応する細胞内で産生されるタンパク質量と相関しないことである。さらに、一旦産生されたタンパク質は、細胞内でのわずかな化学修飾（翻訳後修飾）によって、その酵素活性（およびそれによる生物学的機能）が著しく影響を受け得る。したがって、できるだけ多数のタンパク質（特に、酵素）の酵素活性の並行分析を行う必要がある。このようなアプローチにより、特に、定義された酵素の基質特異性を迅速に決定することが可能であり、同様に、知識ベースのインヒビターのデザインまたは医薬品もしくは医薬品候補物、特に副作用予測の一部としての選択試験の重要な要件である。

【 0 0 0 4 】

先行技術では、ペプチドまたはタンパク質のアセンブリを、ガラス (J. Robles, M. Beltran, V. Marchan, Y. Perez, I. Travasset, E. Pedroso, A. Grandas, 1999, 「Towards nucleopeptides containing any trifunctional amino acid」, Tetrahedron, 55, 13251-13264)、セルロース (D.R. Englebrechtsen, D.R.K. Harding, 1994, 「High yield, directed immobilization of a peptide-ligand onto a beaded cellulose support」, Pept. Res., 7, 322-326)、ニトロセルロース (S.J. Hawthorne, M. Pagano, P. Harriott, D.W. Halton, B. Walker, 1998, 「The synthesis and utilization of 2,4-dinitrophenyl-labeled irreversible peptidyl diazomethyl ketone inhibitors」, Anal. Biochem., 261, 131-138)、PTFEメンブレン (T.G. Vargo, E.J. Bekos, Y.S. Kim, J.P. Ranieri, R. Bellamkonda, P. Aebischer, D.E. Margevich, P.M. Thompson, F.V. Bright, J.A. Gardella, 1995, 「Synthesis and characterization of fluoropolymeric substrata with immobilized minimal peptide sequences for cell adhesion studies. 1.」, J. Biomed. Mat. Res., 29, 767-778)、酸化チタン (S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. Sigrist, 1997, 「Immobilization of the cell-adhesive peptide ARG-GLY-ASP-CYS (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment」, J. Materials Science-Materials in Medicine, 8, 867-872)、一酸化ケイ素 (T. Koyano, M. Saito, Y. Miyamoto, K. Kaifu, M. Kato, 1996, 「Development of a technique for microimmobilization of proteins on silicon wafers by a streptavidin-biotin reaction」, Biotech. Progress., 12, 141-144)、または金 (B.T. Houseman, M. Meksich, 1998, 「Efficient solid-phase synthesis of peptide-substituted alkanethiols for the preparation of substrates that support the adhesion of cells」, J. Org. Chem., 63, 7552-7555)などの種々の表面上に固定するか、ペプチドの段階的合成を、対応するガラス表面上 (S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, 1991, 「Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis」, Science, 251, J.P. Pellois, W. Wang, X.L. Gao, 2000, 「Peptide synthesis based on t-Boc chemistry and solution photogenerated acids」, J. Comb. Chem., 2, 355-360)、セルロース上 (R. Frank, 1992, 「Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support」, Tetrahedron, 48, 9217-9232, A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻, 「Combinatorial Peptide Library Protocols」, 25-39頁, S. Cabilly編, Humana Press Inc., Totowa, NJ, Topert, F., Oires, C., Landgraf, C., Oschkinat, H. and Schneider-Mergener, J., 2001, 「Synthesis of an array comprising 837 variants of the hYAP WW protein domain」, Angew. Chem. Int.編, 40, 897-900)、またはポリプロピレン上 (M. Stankova, S. Wade, K.S. Lam, M. Lebl, 1994, 「Synthesis of combinatorial libraries with only one representation of each structure」, Pept. Res., 7, 292-298, F. Rasoul, F. Ercole, Y. Pham, C.T. Bui, Z.M. Wu, S.N. James, R.W. Trainor, G. Wickham, N.J. Maeji, 2000, 「Grafted supports in solid-phase synthesis」, Biopolymers, 55, 207-216, H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, 2000, 「Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides」, Biopolymers, 55, 188-206)、またはキチン上 (W. Neugebauer, R.E. Williams, J.R. Barbier, R. Brzezinski, G. Willick, 1996, 「Peptide synthesis on chitin」, Int. J. Pep

t. Prot. Res., 47, 269-275)、またはセファロース(W. Tegge, R. Frank, 1997, 「Peptide synthesis on Sepharose beads」、J. Peptides Res., 49, 355-362、R. Gast, J. G lokler, M. Hoxter, M. Kiess, R. Frank, W. Tegge, 1999, 「Method for determining protein kinase substrate specificities by the phosphorylation of peptide libraries on beads, phosphate-specific staining, automated sorting, and sequencing」、Anal. Biochem., 276, 227-241)で直接行っていた。

【発明の開示】

【0005】

本発明の目的は、高処理システムでの使用に適切である一方で、非常に少量の酵素活性またはサンプル体積で実施可能な酵素活性の基質特異性の試験手段を提供することにある。特に、本手段は、先行技術による手段、特に、先行技術に記載のペプチドおよびタンパク質(「アレイ」と記載する)と比較してシグナル/ノイズ比を改良することを目的とする。

10

【0006】

本発明の別の目的は、このような手段の製造方法、酵素活性の基質特異性の決定方法、および活性物質の選択性の決定方法を提供することにある。

【0007】

この目的は、本発明により、支持材の平面上に複数のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が方向性をもって固定されたアセンブリを得る工程と、酵素活性を前記アセンブリと接触および/またはインキュベートする工程と、前記アセンブリ上に固定された1つのアミノ酸配列と前記酵素活性との間の反応を検出する工程とを含み、前記酵素活性と前記アセンブリとの間の反応中に少なくとも1つのアミノ酸配列の分子量が変化する、酵素活性の基質特異性の決定方法によって解決される。

20

【0008】

1つの態様では、反応を支持材の表面上に固定したアミノ酸配列上でまたは前記アミノ酸配列を使用して検出することを提供する。

【0009】

別の態様では、1つのアミノ酸配列、好ましくは、酵素活性と反応するアミノ酸配列上の共有結合の形成または切断により分子量が変化するを提供する。

【0010】

さらに別の態様では、分子量の変化の検出によって反応を検出することを提供する。

30

【0011】

最後に、1つの態様では、反応を、オートラジオグラフィー、プラズモン共鳴分光法、および蛍光分光法を含む群より選択される検出方法によって検出することを提供する。

【0012】

1つの態様では、少なくとも1つのアミノ酸配列が酵素活性の基質であることを提供する。

【0013】

別の態様では、少なくとも2つの異なる酵素活性のアミノ酸配列のアセンブリがそれぞれ少なくとも1つの基質を有することを提供する。

40

【0014】

好ましい態様では、酵素活性が、キナーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、パルミチルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、スルファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、アセチラーゼ、およびプロテアーゼを含む群より選択されることを提供する。

【0015】

別の態様では、アセンブリ上に固定されたアミノ酸配列と酵素活性との間の反応の検出を、好ましくは時間的間隔をおいて何度も繰り返すことを提供する。

【0016】

さらに別の態様では、酵素活性をサンプル中で決定し、前記サンプルは、好ましくは尿

50

、液、痰、糞便、リンパ液、細胞溶解物、組織溶解物、器官溶解物、抽出物、未処理抽出物、精製調製物、および非精製調製物を含む群より選択されることを提供する。

【0017】

1つの態様では、表面が無孔表面であることを提供する。

【0018】

別の態様では、支持材がガラスであることを提供する。

【0019】

さらに別の態様では、アミノ酸配列が表面上の硫黄含有基を介して固定されていることを提供する。

【0020】

第2の局面では、表面上、好ましくは固相支持体表面上の複数のアミノ酸配列のアセンブリであって、アミノ酸配列が支持材の平面上に方向性をもって固定されており、少なくとも1つのアミノ酸配列が酵素活性の基質であり、酵素活性の結果として基質上で分子量が変化することを特徴とするアセンブリによって目的が解決される。

【0021】

1つの態様では、分子量の変化が、基質上の共有結合の形成または切断の結果として起こることを提供する。

【0022】

別の態様では、少なくとも2つの異なる酵素活性のアミノ酸配列のアセンブリが少なくとも1つの基質をそれぞれ有することを提供する。

【0023】

さらに別の態様では、平面が無孔表面であることを提供する。

【0024】

1つの態様では、支持材が、ケイ酸塩、セラミック、ガラス、金属、および有機支持材を含む群より選択されることを提供する。

【0025】

別の態様では、アミノ酸配列が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質ならびにこれらの各誘導体を含む群より選択されることを提供する。

【0026】

さらに別の態様では、各アミノ酸配列またはアミノ酸配列群が別のアミノ酸配列またはアミノ酸配列群に関して定義された配置を有することを提供する。

【0027】

別の局面では、本発明の目的は、本発明のアセンブリを含む支持体によって解決される。

【0028】

1つの態様では、支持体がベース支持材を含むことを提供する。

【0029】

別の態様では、複数のアミノ酸配列のアセンブリが、1つまたは複数の支持体表面上に配置されていることを提供する。

【0030】

別の局面では、2つの支持体がそれぞれギャップによって分離されている、本発明の少なくとも2つの支持体を含む支持体アセンブリによって目的が解決される。

【0031】

1つの態様では、第1の支持体上の少なくとも1つのアセンブリが第2の支持体上の少なくとも1つのアセンブリに対面していることを提供する。

【0032】

別の態様では、ギャップの幅が約0.01mm～10mm、好ましくは約0.1mm～2mm、より好ましくは約0.5mm～1mmであることを提供する。

【0033】

さらに別の局面では、本発明の方法における本発明のアセンブリおよび/または本発明

10

20

30

40

50

の支持体および／または本発明の支持体アセンブリの使用によって本発明の目的が解決される。

【0034】

本発明は、アミノ酸配列が表面上に方向性をもって固定され、且つ表面が平面である、表面上の複数のアミノ酸配列（図12A、 $B_1 \sim B_3$ を参照のこと）のアセンブリを使用して、アセンブリ中に含まれる1つまたは複数のアミノ酸配列の潜在的な相互作用パートナー（図12A、C）（相互作用単位／液体体積で示される非常に少量の潜在的な相互作用パートナー）を含むサンプルにアセンブリが接触した際に、1つまたは複数のアミノ酸配列と潜在的な相互作用パートナーとの間の結合事象の検出に十分であり得るという驚くべき発見（図12Aを参照のこと）に基づく。潜在的な相互作用パートナーは、好ましくは酵素活性で

10

【0035】

多孔質表面を使用した場合（実施例と同様にセルロースまたは多孔質ガラスを使用した場合）、大量の材料（この場合、単位面積あたりアミノ酸配列）を固定して良好なシグナル強度および測定シグナルが比例的な広い領域を得ることができるが、それと同時に表面が広いために、アミノ酸配列と支持材との間に非特異的相互作用を生じ、バックグラウンドシグナルがより大きくなる。さらに、このような多孔質表面は、アセンブリの開発またはアセンブリを保有する支持材のコーティングに実質的により大量の材料が必要である（すなわち、より大量の種々の各アミノ酸配列が必要）。多孔質表面の結果と同様に、実際の分析プロセスには、より大量のサンプル材料が必要である。サンプル材料は、1つまたは複数のアミノ酸配列の可能な相互作用パートナーを含む材料を含む。しかし、それぞれの場合で、より大きなサンプル体積の供給によってこのサンプル材料の増加を補うことができず、むしろアセンブリと接触するか接触すべきサンプル中の潜在的相互作用パートナー比の状態を増加させる必要があり得る。これには、分析すべきサンプル材料を精製する必要があるが、このような精製中にかなりの量が喪失することが多いため、表面上の分子アセンブリ用の多孔質表面の使用はサンプル濃度が比較的低い相互作用パートナーの検出には不適切である。潜在的な相互作用パートナーが酵素活性を含む場合（本明細書中では、一般に、酵素および任意の触媒活性分子を含む（例えば、触媒活性核酸も含む））、サンプル材料または相互作用パートナー（すなわち、先行技術のアセンブリを使用する際に必要な酵素比活性）の精製または濃縮の影響下で、一定の酵素活性を決定することができない状況があり得る。このことが、サンプル中で必ずしも過半量を占める必要性のない、生物学的に重要な酵素活性があることが多い一方で、アミノ酸配列を含むアセンブリの使用を非常に制限している。従って、例えば、本発明のアセンブリを使用して精製という意味でのさらなる処理を行うことなく単離細胞を分析することができ、細胞中に含まれる比活性の低い酵素相互作用パートナーを検出することができる。

20

30

【0036】

多孔質表面使用におけるさらなる欠点は、不可避免的に毛管力が働き、高処理システムで特に必要な最小化のいずれをも妨げることである。言い換えれば、多孔質支持体システムを使用する場合、アセンブリ中で一定のアミノ酸配列密度のみを達成することができる。現在、多孔性の基準を形成する物理化学的性質の結果として、これはセルロースが $100/\text{cm}^2$ の場合に制限される。

40

【0037】

しかし、他方では、負荷能力がしばしば限定要因となるので、平面のみの使用は、本発明のアセンブリを使用して達成可能なシグナル強度（特に、シグナル対ノイズ比）の範囲内とするためのアセンブリの調製にさらに適切ではない。平面に対して規定の孔幅を有するポリアクリルアミドゲル（無孔表面）を適用することによるこれらの限定要因の回避の試みは、多孔質膜の欠点がある後再び出現するために所望の成功を収められなかった。

50

【0038】

本発明を使用して、表面上の複数のアミノ酸配列のアセンブリ（表面上の濃縮物だけでなく、アセンブリ上に含まれるアミノ酸配列の特定の固定型）の構築方法を応用し、アセンブリの驚くべき性能が明らかとなる。平面は、比較的少量の異なるアミノ酸配列しか必要とせず、さらに、表面上の方向性のある固定の結果として、最適な相互作用パートナー（特に、酵素活性の基質）が存在し、滑らかさ（すなわち、好ましくは無孔表面）の結果として比較的負荷能力が低いにもかかわらず、有意なシグナルが達成され、平面の結果と同様に、非特異的吸収が起こらず、それにより、シグナル対ノイズ比が崩れない。実施例に記載のモデル計算手段によって示されるように、本発明のこれら2つの特徴の組み合わせの結果として、図3および4で認められるように、シグナル対ノイズ比が3000倍改良される。

10

【0039】

本発明の表面上の複数のアミノ酸配列のアセンブリでは、表面は、一定の範囲で複数のアミノ酸配列が固定された基板として機能する。共有結合で固定することができる。しかし、共有結合による固定に加えて、他の固定形態、特に、吸着固定または特異的相互作用系を介した固定も可能である。特に好ましい固定は、支持材表面に対してアミノ酸配列が化学選択的に結合される共有結合である。本発明では、当業者に公知の多数の反応を使用することができる（Lemieux, G.A. & Bertozzi, C.R., 1998, 「Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells」、TIBTECH, 16, 506~513、これに関しては、図11を参照のこと）。必要な方向性固定を得る目的で、各相互作用条件下でアミノ酸配列と表面との間に実質的にたった1つの特定の化合物が形成されることが基本的に確保されるべきである（図12、リンカーA）。したがって、アミノ酸配列側の反応基の選択は、実質的に各配列に依存する。あるいは、全アミノ酸配列に対する末端構造の基準が得られ、この末端構造により、表面、特に活性表面との特異的反応に利用可能となることが本発明の範囲内で得られる（図12、リンカーA）。典型的には、化学選択的反応の間、アミノ酸配列中に含まれるアミノ基またはカルボキシル基に悪影響を与えない。適切な反応の例は、ハロカルボン酸およびチオール由来のチオエーテルの形成（ハロカルボン酸およびチオール由来のチオエーテルの形成を含む）、チオールおよびマレイニミド由来のチオエーテルの形成、チオエステルおよび1,2-アミノチオール由来のアミド結合の形成、ジチオエステルおよび1,2-アミノチオール由来のチオアミド結合の形成、アルデヒドおよび1,2-アミノチオール由来のチアゾリジンの形成、アルデヒド/ケトンおよび1,2-アミノアルコール由来のオキサゾリジンの形成、アルデヒド/ケトンおよび1,2-ジアミン由来のイミダゾールの形成（図11も参照のこと）、チオアミドおよび α -ハロケトン由来のチアゾールの形成、アミノ-オキシ化合物および α -イソチオシアナト-ケトン由来のアミノチアゾールの形成、アミノ-オキシ化合物およびアルデヒド由来のオキシムの形成、アミノ-オキシ化合物およびケトン由来のオキシムの形成、ヒドラジンおよびアルデヒド由来のヒドラゾンの形成、ヒドラジンおよびケトン由来のヒドラゾンの形成である。さらに、図11に記載のR1~R5ラジカルまたは上記の化学的選択反応中の残基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルもしくはアリールラジカルまたはアルキルが分岐および非分岐 $C_1 \sim 20$ アルキル、 $C_3 \sim 20$ シクロアルキル、好ましくは分岐および非分岐 $C_1 \sim 12$ アルキル、 $C_3 \sim 12$ シクロアルキル、特に好ましくは分岐および非分岐 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 6$ シクロアルキルラジカルとして存在する複素環式化合物であり得る。アルケニルは、分岐および非分岐 $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 20$ アルキル-O- $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、 $C_1 \sim 20$ (-O/S- $C_2 \sim 20$) $_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、アリール- $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐ヘテロシクリル $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、 $C_3 \sim 20$ シクロアルケニルラジカル、好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 12$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 12$ (-O/S- $C_2 \sim 12$) $_2 \sim 12$ アルケニルラジカル、特に好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 6$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 6$ (-O/S- $C_2 \sim 8$) $_2 \sim 8$ アルケニルラジカルとして存在し、アルキニルは、分岐および非分岐 $C_2 \sim 20$ アルキニル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 20$ (-O/S- $C_2 \sim 20$) $_2 \sim 20$ アルキニルラジカル、好ましくは分岐および

20

30

40

50

非分岐 C_{2-12} アルキニルラジカル、分岐および非分岐 $C_{1-12}(-O/S-C_{2-12})_{2-12}$ アルキニルラジカル、特に好ましくは分岐および非分岐 C_{2-6} アルキニル、分岐および非分岐 $C_{1-6}(-O/S-C_{2-8})_{2-8}$ アルキニルラジカルとして存在し、シクロアルキルは、架橋および非架橋 C_{3-40} シクロアルキルラジカル、好ましくは架橋および非架橋 C_{3-26} シクロアルキルラジカル、特に好ましくは架橋および非架橋 C_{3-15} シクロアルキルラジカルとして存在し、アリールは、置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アズレニル、アントラセニル、インダセニル、アセナフチル、フルオレニル、フェナレニル、フェナントレニルラジカル、好ましくは置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アズレニル、アントラセニル、インデニル、インダセニル、アセナフチル、フルオレニルラジカル、特に好ましくは置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アントラセニルラジカル、ならびにその部分的水和誘導体として存在する。複素環式化合物は、1~7個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の3~15員環の単環系、二環系、および三環系、好ましくは1~5個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の3~10員環の単環系、二環系、および三環系、特に好ましくは1~3個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の5、6、および10員環の単環系、二環系、および三環系であり得る。

10

【0040】

さらに、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロ原子、複素環式化合物、生体分子または天然物質では、以下の置換基の0~30個（好ましくは、0~10個、特に好ましくは0~5個）が単独で存在するか互いに組み合わせることができる。フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、水酸基、アミド、エステル、酸、アミン、アセタール、ケタール、チオール、エーテル、リン酸塩、硫酸塩、スルホキシド、過酸化物、スルホン酸、チオエーテル、ニトリル、尿素、カルバメートであり、フッ素、塩素、臭素、水酸基、アミド、エステル、酸、アミン、エーテル、リン酸塩、硫酸塩、スルホキシド、チオエーテル、ニトリル、尿素、カルバメートが好ましく、塩素、水酸基、アミド、エステル、酸、エーテル、ニトリルが特に好ましい。

20

【0041】

方向性固定により、全てのアミノ酸配列が所定の反応基または反応基集団を介して表面に結合することが本明細書中で特に理解されるはずである。この結合特異性の結果として、有用なエントロピーの限度内で各アミノ酸配列がエネルギー的に好ましい状態で存在し、それによりこのような範囲で固定されたアミノ酸配列は概して類似の二次構造および三次構造で存在する。

30

【0042】

概念「複数のアミノ酸配列のアセンブリ」は、本明細書中では、特に、各アミノ酸配列が表面上の特定の位置に固定されていると理解される。好ましくは、これらの各位置を固定することができる。従って、位置は、1つのアミノ酸配列の種がそれぞれ実質的に固定されている個別の位置である。言い換えれば、表面上のそれぞれ固定されたアミノ酸配列の位置を誘導することができる地図が存在する。各アミノ酸配列は、複数の分子を示すことができるが、そのアミノ酸配列に関して（すなわち、これらを形成するアミノ酸の型および配列）実質的に同一である。アミノ酸配列の同一性を、実質的にはアミノ酸配列の製造方法によって決定する。アミノ酸配列をアセンブリの表面上にてインサイチューに合成し、可能な全形態を本明細書中で実行可能である（すなわち、アミノ酸群を共に添加し、各ブロックを連続的に一列に並べ、ブロックまたはブロックの配列を既に固定されたアミノ酸配列に固定または結合させるブロック合成技術の使用と同一の方法でアミノ酸配列を形成する各アミノ酸の連続的結合）ことは本発明の範囲内である。

40

【0043】

各合成工程またはカップリング工程での収量が常に完全ではないことが、以前に記載の意味での種々のアミノ酸配列中が幾らか不均一となり得ることが当業者に理解される。これは、アミノ酸配列の合成（アミノ酸構築ブロックあたり、1つのカップリング反応および1つの保護基切断ならびに一般的に合成の最後に行われる1つの側鎖官能基の全保護基の

50

同時切断反応)と同様に多数の反応工程を必要とする合成で特に問題であり得る。したがって、例えば、41または81の反応工程が必要な、20個のアミノ酸構築ブロックまたは40個のアミノ酸構築ブロックからなる、推定平均収率が95%の1つのアミノ酸配列の合成の際に、推定される理論上の収率はたった $0.95^{41} = 0.122$ (12.2%) または $0.95^{81} = 0.0157$ (1.57%) である。推定平均収率が99%であっても、上記の例では、66.2%または44.3%しか得られない。したがって、研究すべき酵素反応の間に、所望のアミノ酸配列に加えてこれらの制限の結果として、1つまたは複数のアミノ酸構築ブロックの不在によって区別される多数の他のアミノ酸配列が存在することが明らかである。正確には、当業者にRumpf配列として公知のこれらの副産物は、一定の環境下で、表面上に整列されたアミノ酸配列を修飾する酵素活性とのインキュベーションの結果を重大に変化させるか、結果の解釈を困難にし得る。例えば、この基質内に含まれるアミノ鎖基を使用した表面上または表面でのキナーゼ基質の固定の際に、複数(固定すべき化合物中に存在するアミノ基の数に依存する)の反応可能性およびそれによる表面上の化合物の最終的な方向の可能性が存在する。この固定された化合物(キナーゼ基質)と少なくとも1つのキナーゼ活性を含む生体液とのその後のインキュベーションの際の酵素/基質/複合体の有効な形成にたった1つまたは複数のこれらのアミノ基を必要とする場合、このような非特異的固定は、固定基質の小集団のみが正確な様式で固定され、それにより測定シグナルは検出限度以下であるという結果を有し得る。したがって、特異的または方向性固定が非常に有利である。この場合、固定事象では、固定されるべき化合物と化合物が固定される表面との間の接触がそれぞれの場合で同一の様式で起こり、全化合物が所定および予想可能な方向で表面上または表面に結合する。

10

20

【0044】

複数のアミノ酸配列は、少なくとも2つの異なるアミノ酸配列からなる。異なる部位で固定されたアミノ酸配列を表面上の別の部位で固定することができる。これを、例えば、対照の目的で達成することができる。

【0045】

平面は、実質的に二次元に整列された表面であり得る。特に、本発明では、複数のアミノ酸配列を保有する球面表面またはこのような表面の実質的な一部であることはない。平面の開発の際、各アミノ酸配列が位置付けられた異なる位置は、表面上の別の異なる位置から三次元構造によって分離されていないか少なくとも実質的に分離されていないことが好ましい。

30

【0046】

全ての生体耐性、官能基化、または官能基化可能な材料を、本発明の範囲内の本発明のアセンブリを保有し得る表面材料または支持材料として使用することができる。これらの材料は、例えば、固体支持プレート(モノシリックブロック)、膜、フィルム、またはラミネートとして存在し得る。適切な材料は、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ハロゲン化ポリオレフィン(PVDF、PVCなど)などのポリオレフィンならびにポリテトラフルオロエチレンである。無機材料としては、例えば、セラミック、ケイ酸塩、シリコン、およびガラスを使用することができる。非金属支持プレートが好ましいが、潜在的に非特異的に吸着する傾向があるにもかかわらず、金属支持材の使用も本発明の範囲内である。このような金属の例は、金または例えば酸化チタンなどの酸化金属である。

40

【0047】

実際に選択された材料に関係なく、ガラスが好ましく、表面は非孔質であり、表面で毛管力が発生しないか実質的に発生しないことも本発明に不可欠である。

【0048】

アセンブリの開発の際、実際には表面のデザインについて多くの可能性(すなわち、複数のアミノ酸配列を保有する表面)が存在する。基本的には、アミノ酸配列が方向性を持って固定された表面は同時に支持材であることが可能である。しかし、反応性表面は支持材とは異なることもまた可能である。例えば、(平面)表面を形成する材料がフォームまたはフィルム中に存在し、特に安定性を目的としてさらにベース支持材に適用する場合に

50

、このようなシナリオが得られる。

【0049】

方向性固定の目的のために、特に支持材上のアミノ酸配列の共有結合によってこれが起こる場合、支持プレートの表面に官能基を付加することができる。複数の連続的官能基化が基本的に可能であるが、選択される支持材に依存して、官能基化を省略することもできる。

【0050】

表面へのアミノ酸配列の共有結合に既に適切な第1の官能基化を、反応基としてのアミノ基および/またはカルボキシ基の提供において達成することができる。このような官能基化を、適用した反応基の化学的性質に関係なく、第1の官能基化として本明細書中でデザインする。カルボキシル基を、クロム酸での酸化（例えば、表面を得る材料としてポリオレフィンから出発）によって生成することができる。あるいは、例えば、塩化オキサリルとの高圧反応ならびにプラズマ酸化、アクリル酸などのラジカルまたは光誘導物の付加によりこれを行うこともできる。表面で二重結合が得られるベース触媒の除去の結果として、ハロゲン化ポリオレフィンなどのハロゲン化材料により、アミノおよびカルボキシ反応基を生成することができ、それにより反応性二重結合がカルボキシまたはアミノ官能基が付加される。

【0051】

セラミック、ガラス、酸化ケイ素、および酸化チタンを、例えば、アミノプロピルトリエトキシシランなどの複数の形態で市販されている置換シランを使用して簡単に官能基化を行うことができる。例えば、プロモ酢酸との直接的カルボキシメチル化、対応するアミノ酸誘導体とのアシル化（例えば、フルオレニルメトキシカルボニル-3-アミノプロピオン酸とのジメチルアミノピリジン触媒カルボジイミドカップリング、または対応するビスイソ（チオ）シアネートとの一変換によるイソ（チオ）シアネートの生成など）などの好二選択性反応が特に有利である。特に有利な方法は、カルボニルジイミダゾール、ホスゲン、トリホスゲン、p-ニトロフェニルクロロホルミエート、またはチオカルボニルジイミダゾールとの反応およびその後の表面上の安定なウレタン結合を介した支持材へのアミノ官能基の適用のためのジアミンまたは簡単に保護したジアミンとの反応である。

【0052】

本発明によれば、表面上に固定されたアミノ酸がスペーサーを有することができることを提供する。アミノ酸配列が特定の空間構造を占め、それにより酵素活性に接近可能な酵素活性の基質である場合、このようなスペーサーが特に好ましい。このようなスペーサー（本明細書中で「スペーサー」とも呼ばれる）使用の結果として、酵素活性または活性の実際の基質であり、自由度および吸着などの表面環境がさらに進歩し、熱力学的自由度が変化するアミノ酸配列が出現する。スペーサーは、実質的に、少なくとも2つの官能基または官能基化可能な基を含む任意の生体適合分子であり得る。表面とアミノ酸配列との間のエレメントとして、使用した状態でスペーサーを挿入する。

【0053】

以下の化合物のクラスがスペーサーとして適切である。

特に鎖長がC2～C30、特にC4～C8の分岐または非分岐アルカン、

好ましくは1～5個のポリエチレンオキシド単位またはポリプロピレンオキシド単位からなるポリエーテル（すなわち、ポリエチレンオキシドまたはポリプロピレンオキシドのポリマー）、

ポリグリコールおよびその誘導体（例えば、0,0'-ビス（2-アミノプロピル）-ポリエチレングリコール500および2,2'-（エチレンジオキシド）-ジエチルアミンなど）などの分岐または非分岐ポリアルコール、

特に1～100モノマー単位、特に好ましくは1～10モノマー単位からなるポリウレタン、ポリヒドロキシ酸、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリアミド、ポリエステル、ポリスルホン、

上記アルカンと上記ポリエーテル、ポリウレタン、ポリヒドロキシ酸、ポリカーボネー

10

20

30

40

50

ト、ポリイミド、ポリアミド、ポリアミノ酸、ポリエステル、およびポリスルホンとの組み合わせ、

好ましくは鎖長がC2～C30、特に好ましくは鎖長がC2～C8の分岐または非分岐ジアミノアルカン（例として、1,3-ジアミノプロパン、1,6-ジアミノヘキサン、および1,8-ジアミノオクタンから作製することができるものならびにポリエーテル、好ましくは上記ポリエーテルとの組み合わせ（例えば、1,4-ビス-（3-アミノプロポキシ）ブタンなど））、

ジカルボン酸およびその誘導体（例えば、特にC2～C30ジカルボン酸、好ましくは鎖長がC2～C10、特に好ましくは鎖長がC2～C6の飽和または不飽和の分岐または非分岐ヒドロキシ、メルカプト、およびアミノジカルボン酸など（例えば、コハク酸およびグルタル酸など））、および

好ましくは1～20アミノ酸残基長、特に好ましくは1～3アミノ酸残基長のアミノ酸およびペプチド（例えば、リジンの三量体、3-アミノプロピオン酸の二量体、および6-アミノカプロン酸の単量体）。

【0054】

スペーサーが2つの官能基の末端を有するという事実の結果として、表面上に固定されるべきアミノ酸がそのC末端もしくはN末端を介するか固定されるべきアミノ酸配列内の別の官能基を介して固定されるように官能性を選択することが基本的に可能である。C末端を介して固定される場合、C末端上で作用するスペーサーの官能基は、好ましくはアミノ基である。アミノ酸配列がN末端によって表面に固定される場合、スペーサーの対応する官能基は、カルボキシル基である。

【0055】

本発明のアセンブリでは、スペーサーは分岐スペーサーであり得る。このような分岐スペーサーは、デンドリマー構造または簡単にデンドリマーとも呼ばれ、当業者に公知である。核酸固定のためのデンドリマー構造は、例えば、Beier, M. & Hoheisel, J.D., 1999、「Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA microchips」、9、1970～1977に記載されている。これらのデンドリマー構造の機能は、単位面積あたりの反応基数の増加およびそれによるシグナル強度の増加に基づく。ほとんど全ての官能基または官能基化可能な基を有し、アミノ酸配列の固定が可能なデンドリマー構造を得ることができる。このようなデンドリマー構造使用の結果として、平面の単位面積あたりの反応基の数を、2～100倍、好ましくは2～20倍、より好ましくは2～10倍増加させることができる。

【0056】

アクリル酸もしくはアクリル酸誘導体（アクリル酸クロリドなど）または α プロモカルボン酸もしくは α プロモカルボン酸誘導体（プロモアセチルプロミドなど）でのアシル化、適切なポリアミン（例えば、テトラエチレンペンタミンなど）のマイケル付加およびその後のアクリル酸もしくはアクリル酸誘導体（アクリル酸クロリドなど）または α プロモカルボン酸もしくは α プロモカルボン酸誘導体（プロモアセチルプロミドなど）でのさらなるアシル化ならびに適切なポリアミンのさらなるマイケル付加を含む反応配列によってアミノ官能性を有する表面が得られる場合、デンドリマー構造の構築を行うことができる。好ましくは、表面の親水性を増加させるためにポリアミン自体が親水性であるようにポリアミンを選択する。このようなポリアミンの例は、1,4-ビス-（3-アミノプロポキシ）ブタンである。

【0057】

表面の第1の官能基化に加えて、第1の官能基化を基に構築する第2の官能基化を行うことができる。言い換えれば、表面の官能基を、さらなる基準によって広範に官能基化する。官能基化表面に直接か、スペーサーまたはデンドリマー構造を使用して作製した表面上に第2の官能基化を行うことができる。

【0058】

アミノ酸配列、チオール官能基、イミダゾール官能基、およびグアニド官能基中に存在するアミノ基およびカルボキシル基の結果として、表面上のアミノ酸配列の方向に関して

10

20

30

40

50

均一に固定できないという点での第2の官能基化の理由を認めることができる。第2の官能基化により、方向性固定を達成するためのさらなる化学的選択反応が利用される。

【0059】

非タンパク質生成官能基によって区別される全ての化合物は、この第2の官能基化に適切である。例えば、以下の化合物を挙げることができる。マレイニミド化合物（マレイニミドアミンまたはマレイニミドカルボン酸など）； α -ハロケトン（ブロモピロラセミ酸または4-カルボキシ- α -ブロモアセトフェノンなど）、 α -イソチオシアナト-ケトン（4-カルボキシ- α -イソチオシアナト-アセトフェノンなど）、アルデヒド（カルボキシベンズアルデヒドなど）、ケトン（レブリン酸など）、チオセミカルバジド、チオアミド（コハク酸モノチオアミドなど）、 α -ブロモカルボン酸（ブロモ酢酸など）、ヒドラジン（4-ヒドラジノ安息香酸など）、0-アルキルヒドロキシアミン（アミノオキシ酢酸など）、およびヒドラジン（グルタル酸モノヒドラジンなど）。

【0060】

本発明のアセンブリ開発の際のさらなる基準として、アミノ酸配列を用いて得られない表面の部位または領域をブロックすることができる。ブロッキングにより、必要ならば官能基化表面を含むアミノ酸配列の化学的選択反応中または反応後に、まだ反応していないが依然として表面上の反応性を示す集団または基の不活化を確実にする。付加した酵素活性または使用した生体サンプルの他の構成要素がブロックされておらず、それにより大きなバックグラウンドシグナルを発生する可能性がある表面上の反応基と非特異的に反応するので、このブロッキング反応は必要である。表面とのこのような非特異的反応は、生化学的分析における望ましくないシグナル対ノイズ比の原因になることが多い。立体的に損傷を与えず、ブロックすべき基と非常に良好に反応し、可能な限り望ましい表面特性が得られる化合物がこのブロッキングに適切である。これらの化合物の選択は、サンプルの型または1つのアミノ酸配列と相互作用する相互作用パートナーに依存する。酵素活性が疎水性表面に非特異的に結合することが好ましいことが公知である場合に化合物を親水性と判断し、酵素活性が疎水性表面に非特異的に結合することが好ましいことが公知である場合に化合物を疎水性と判断する。したがって、タンパク質などの生体分子は、例えば、正確な生物学的機能のために正確に定義された三次元構造が必要であることが当業者に公知である。この三次構造は、環境に著しく依存する。したがって、親水性溶媒である水中でのタンパク質は、全て、より正確にはできるだけ多数の集団を内在させる傾向がある。このようなタンパク質がより疎水性の高い環境（疎水性表面）に曝されると、タンパク質が過剰に折りたたまれるか折りたたまれずに不活化し得る。それに対して、天然に（疎水性）生体膜内に存在するタンパク質が公知である。このようなタンパク質は、親水性表面との接触の際に過剰に折りたたまれて、変性または不活化する。このような場合、疎水性表面が望ましい。

【0061】

本発明のアセンブリのアミノ酸配列の構成要素は、好ましくは、L型およびD型アミノ酸を含む群より選択されるアミノ酸である。さらに、アミノ酸を、天然および非天然アミノ酸を含む群より選択することができる。前記各アミノ酸群内の好ましい群は、対応する α アミノ酸である。アミノ酸配列は、任意の1つの前記群由来のアミノ酸配列からなり得る。したがって、例えば、D型およびL型アミノ酸の組み合わせは、排他的にD型またはL型アミノ酸のいずれかからなるアミノ酸配列と同一の方法で本発明の範囲内である。さらに、アミノ酸配列の構成要素は、アミノ酸以外の分子を含み得る。例としては、チオキソアミノ酸、ヒドロキシ酸、メルカプト酸、二炭酸、ジアミン、ジチオキソ炭酸、酸、およびアミンである。別の誘導アミノ酸配列形態は、いわゆるPNA（ペプチド核酸）である。

【0062】

アミノ酸配列の密度は、 $1/\text{cm}^2 \sim 2000/\text{cm}^2$ であり、この密度は好ましくは $5/\text{cm}^2 \sim 1000/\text{cm}^2$ であり、特に好ましくは $10/\text{cm}^2 \sim 100/\text{cm}^2$ である。それぞれアミノ酸種を含むことができる表面上の個別の位置のこのような密度を、例えば、ポリプロピレン、ステンレススチール、もしくはタングステンまたは対応する合金などの種々の金属から作製された細い二

10

20

30

40

50

ードル、スロット付ニードルまたは適用すべき物質の混合物を含むリングから構築されたいわゆるピンツール、およびこのリング中に含まれる物質混合物を介してこれに対応する表面に滴下するニードルを使用した圧電駆動ピペティングロボットなどの種々の技術を使用して達成することができる。しかし、モーター駆動スプレーに接続されたキャピラリー（スポッター）もまた適切である。適切なスタンプを使用して固定すべきサンプルを適用することもできる。しかし、適切なピペッター、またはすなわちいわゆるマルチピペッターの使用によって手動で固定すべきアミノ酸配列を適用することもできる。アミノ酸配列の直接的インサイチュー合成によって上記の個別の位置の密度を得ることがさらに可能である。(M. Stankova, S. Wade, K.S. Lam, M. Lebl, 1994, 「Synthesis of combinatorial libraries with only one representation of each structure」、Pept. Res., 7、292~298、F. Rasoul, F. Ercole, Y. Pham, C.T. Bui, Z.M. Wu, S.N. James, R.W. Trainor, G. Wickham, N.J. Maeji, 2000, 「Grafted supports in solid-phase synthesis」、Biopolymers, 55、207~216、H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, 2000, 「Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides」、Biopolymer., 55、188~206、R. Frank, 1992, 「Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support」、Tetrahedron, 48、9217~9232、A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻, 「Combinatorial Peptide Library Protocols」、25~39頁、S. Cabilly編、Humana Press Inc., Totowa, NJ、Topert, F., Oires, C., Landgraf, C., Oschkinat, H. and Schneider-Mergener, J., 2001, 「Synthesis of an array comprising 837 variants of the hYAP WW protein domain」、Angew. Chem. Int.編、40、897~900、S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, 1991, 「Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis」、Science, 251、J.P. Pelliois, W. Wang, X.L. Gao, 2000, 「Peptide synthesis based on t-Boc chemistry and solution photogenerated acids」、J. Comb. Chem., 2、355~360)。

【0063】

本発明のアセンブリならびにその種々の使用および適用の好ましい態様では、種々のアミノ酸配列は、本発明のアセンブリが曝露される相互作用パートナーとしてサンプル中に含まれる、酵素活性の基質または可能な基質である。酵素活性は、本明細書中で一般に原子団、分子、または分子団を分子に移動させることを特徴とする酵素活性と理解すべきである。酵素活性は、本明細書中で一般にキナーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、パルミチルトランスフェラーゼ、ホスファターゼ、スルファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、アセチラーゼ、およびプロテアーゼと理解すべきである。したがって、酵素活性は、必要に応じてチップ上の1つまたは複数のアミノ酸であるアセンブリの1つまたは複数のアミノ酸配列を分子量に関して変更する。このような分子量の変化は、分子量の増減を含むことができ、アミノ酸配列の物理化学的性質または1種のアミノ酸配列がそれぞれ存在する個別の位置のさらなる変化を含み得る。

【0064】

当業者に公知の種々の技術を使用して、1つまたは複数の種々のアミノ酸配列種で結合が起こるかどうかがおよびアミノ酸配列の相互作用パートナーが酵素活性であるか酵素活性を有する範囲内で、各アミノ酸配列で酵素変換が起こるかどうかを検出することができる。したがって、例えば、プロテアーゼによって媒介される、表面に結合した適切な基質分子の傾向の変化によって切断反応を追跡することが可能である。原則的には、表面に結合した分子の分子量が他の分子（補基質）への移行によって変化する全ての反応を、補基質への放射性標識の組み込みによって追跡することができる。この目的のために、表面に結合した修飾分子に組み込まれた放射能を、反応後に定量しなければならない。このような放射性標識の補助により、例えば、キナーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼなどの全トランスフェラー

ぜを、酵素活性に関して特徴付けることができる。あるいは、反応性アミノ酸配列での各酵素反応から生成され、以前に存在しなかった反応基を、その後の特異的反応手段によって検出することができる。例えば、酵素反応後に得られたメルカプト官能基を、Ellman試薬を使用した以下の反応手段によって検出することができる。

【0065】

アセンブリが一定数の異なるアミノ酸種を含むことは、本発明の範囲内である。この場合、アミノ酸配列は表面または支持材上の複数の異なる位置に存在することができる。したがって、一方では、内部標準を達成することができ、他方では、周辺効果を示し記録することができる。

【0066】

本発明のさらなる開発物により、2つのアセンブリ間で2つのアセンブリのアミノ酸配列が伸長する非常に小さなギャップのみが存在するように少なくとも2つまたは複数のアセンブリを連結する（図12Bを参照のこと）。この開発物は、本明細書中で支持体アセンブリと呼ばれる。これは、非常に小さなサンプル体積を使用した複数の試験の実施する可能性を切り開くものである。ギャップ幅は、2mm、好ましくは0.5mm、好ましくは0.1mm未満である。これにより、液体体積は、1mm²の表面積と比較して100nL未満となる。支持体アセンブリを形成するアセンブリが開発物に関して異なることは本発明の範囲内である。これらの相違は、アミノ酸配列が全てまたは部分的に異なるという事実からなり得る。さらに、異なるアセンブリ中のアミノ酸配列を他の異なる位置に完全にまたは部分的に配置することが可能である。

【0067】

本発明のアセンブリにより、多数の実行可能な適用が得られる。このような適用の1つは、酵素活性の基質特異性の決定である（図12、化合物C）。この場合、手順は、第1の工程で、本発明のアセンブリまたはチップを調製し、これを接触させ、必要に応じて各酵素活性を含むサンプルとインキュベートすることである。次いで、アセンブリ上に存在する1つまたは複数のアミノ酸配列（図12Aの化合物B₁～B₃または図12Bの化合物B₁～B₅）と酵素活性（図12の化合物C）との間の反応を検出するが、上記の検出方法を使用することができる。異なる位置での異なるアミノ酸配列種の配置の結果として、異なるアミノ酸配列またはアミノ酸配列種（本明細書中では両用語を同意語として使用する）の反応を、特定の位置に独自に割り当て、これらから酵素活性の基質特異性を決定することができる（図8、9、および10を参照のこと）。

【0068】

基質特異性から開始して、例えば、各反応に及ぼす種々の物質の影響を調査することができる。例えば、反応基質に依存して、酵素活性は低分子化合物の酵素活性を含む反応処方物に付加した要因によって特異的修飾を受けることができる。

【0069】

本発明のアセンブリは、サンプルの酵素活性の異なる分析の表示においても適用される。これに関する特に重要なサンプルは、本発明のこの局面が以下で説明されることに関する細胞のプロテオームである。この場合、以前に記載した適用と異なり、表面上に存在するアミノ酸種ではなく、むしろアセンブリの種々のアミノ酸配列種に関するサンプル中の酵素活性の瞬間的断片に対する一定の範囲に関する各酵素活性の特異性に注目している。この瞬間的断片を、サンプルが得られた時点で支配する一定の条件下で作成した。プロテオームの場合、これは、例えば、サンプルが得られた細胞の一定の化合物への曝露後の状態であり得る。次いで、サンプリング時に支配した条件が変化した（例えば、細胞が化合物にもはや曝露されない）1つまたは複数のさらなるサンプルを採取し、分析を行う。選択された検出方法に依存して、反応事象の結果を、異なる条件下で比較し、この比較から、変化した場合に各反応事象由来のパターンがどの程度変化したかを決定することができる。それに対して、このようなアミノ酸配列のアセンブリを使用して、ある生体サンプルを細胞溶解物などの他のものと比較するか（例えば、パターン認識手段によるある種と異なる種の体液の比較）、得られたパターン手段によってこれらの生体サンプルのカタログ

10

20

30

40

50

を作成することができる。次いで、このようなパターンを、研究した生体サンプルのフィンガープリントとして転用した意味で使用する。したがって、本発明の方法を、同定または個性化に使用することができる。異なる系統的レベルで同定することができる（すなわち、適切に研究したサンプルの株、綱、目、科、属、または型への割り当て）。さらに、同一の型または品種の個体間の型のレベルで同定することができる。例えば、この方法を、科学捜査で使用することができる。本方法を、癌などの病的状態または標準と比較して変化した酵素活性パターン（量的および質的）の決定、診断、もしくは予測でさらに適用することができる。

【0070】

本発明を、さらなる特徴、例示的態様、および利点を得ることができる以下の図面および実施例を参照して説明する。

【0071】

ここで図面を詳述する。

【0072】

図1 括弧内に記載したキナーゼ基質（N末端でジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾）を、マイケル付加によってマレイニミド官能基化ガラス表面に結合させた（実施例1）。リン酸化すべきセリンアミノ酸をリン酸化不可能なアミノ酸アラニンと交換したペプチドをネガティブ対照として使用した。第1に、ガラス表面を50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、対応するキナーゼを、ATP/γ³²P-ATP混合物（それぞれ1 μL、5U/mL）と共にスポットし、25 °Cで30分間インキュベートした（実施例29）。対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。

【0073】

図2 それぞれN末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾したペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂および対照ペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂を、マイケル付加によってマレイニミド官能基化表面に結合させた（実施例1、マレイニミドブチリル-β-アラニン-官能基化セルロースならびにマレイニミドブチリル-β-アラニン-官能基化修飾ポリプロピレン膜）。したがって、第1に、修飾表面を、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、プロテインキナーゼAを、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）（それぞれ1 μL、2U/mL）と共にスポットし、25 °Cで30分間インキュベートした（実施例30）。対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。各スポットのシグナル強度を、図の下に示す。選択された実験条件下で、修飾セルロースまたはポリプロピレン表面の場合、原則的に、ATPまたはキナーゼのペプチドへの非特異的結合のみが測定されることが明らかである。しかし、修飾ガラス表面の場合、基質アミノ酸配列のシグナルは、対応する対照アミノ酸配列のシグナルよりも4~5倍強い。

【0074】

図3 N末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾したペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂を、マイケル付加によってマレイニミド官能基化表面に結合させた（マレイニミド官能基化ガラス表面、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651およびマレイニミドブチリル-β-アラニン-官能基化修飾ポリプロピレン膜）。第1に、修飾ガラス表面を、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む20mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、プロテインキナーゼAを、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）（それぞれ1 μL、2U/mL）と共にスポットし、25 °Cで所定の時間インキュベートした（実施例31）。対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。各スポットのシグナル強度を、図の下に示す。選択された実験条件下で、修飾ポリプロピレン表面の場合、原則的に、ATPまたはキナーゼのペプチドへの非特異的結合のみが測定されることが明らかである。しかし、修飾ガラス表面の場合、基質アミノ酸配列へのキナーゼ媒介放射能組み込みについてのクリア時間の依存性を同定することができる。

【0075】

図4 それぞれN末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾した対照ペプチド Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂、ペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂、および合成未処理生成物Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂を、マイケル付加によってマレイニミド官能基化ガラス表面に結合させた（実施例1）。第1に、修飾ガラス表面を、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼA（1U/mLまたは10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した（実施例25）。25 で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。各スポットのシグナル強度を、図の下に示す。選択された実験条件下で、精製アミノ酸配列のシグナル強度は合成生成物のそれよりも500%高いことが明らかである。精製アミノ酸配列のシグナル強度は、対応する対照アミノ酸配列のそれよりも約300倍強い。匹敵するシグナルに必要な活性量が（セルロース表面と比較して）約1/10であることと併せると、シグナルは3000倍改良されている。

10

【0076】

図5 それぞれN末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾した対照ペプチド Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂およびペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂を、マイケル付加によってマレイニミド官能基化ガラス表面に結合させた（実施例1）。第1に、修飾ガラス表面を、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼA（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25 で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。各スポットのシグナル強度を、図の下に示す。選択された実験条件下で、基質アミノ酸配列のシグナル強度は対照生成物のそれよりも800%高いことが明らかである。

20

【0077】

図6 ペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-チオアミド（実施例24を参照のこと）アミノ酸配列で修飾したガラス表面を、室温で200mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）中に溶解し、70列で168ギャップ（全部で11760）のアセンブリ中のそれぞれ1nLのこの溶液を、GesimのNanoPlotterを使用してプロモケトン官能基化ガラス表面にのせた（実施例10）。スポット間の距離は0.3mmであった。次いで、ガラス表面を、マイクロ波処理に2分間供し、室温で3時間インキュベートした。50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面を第2のガラス表面で覆い、プロテインキナーゼA（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した（実施例31を参照のこと）。25 で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。固定キナーゼ基質の結合はプロテインキナーゼAから耐える一方で、ガラス表面は均一で固定密度の大きなばらつきもなく修飾されることが明らかである。本発明で使用したPhosphorImagerの分解能は、バイオチップあたり11000個を超える測定点の分析に十分であることがさらに明らかである。

30

40

【0078】

図7 ペプチドDpr（Aoa）-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂（実施例22を参照のこと）で修飾したガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面を第2のガラス表面で覆い、プロテインキナーゼA（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25 で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した（実施例14を参照のこと）。固定キナーゼ基質の結合はプロテインキナーゼAから耐える一方で、ガラス表面は均一で固定密度の大きなばらつきもなく修飾

50

されることが明らかである。本発明で使用したPhosphoImagerの分解能は、バイオチップあたり950個を超える測定点の分析に十分であることがさらに明らかである。

【0079】

図8 それぞれN末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾した正確に43個のセリンおよび/またはトレオニン含有ペプチド(潜在的なキナーゼの基質ペプチド)ならびに対応する対照ペプチドを、マイケル付加によってマレイニミド官能基化ガラス表面に結合させた(実施例18)。対照ペプチドでは、セリンおよび/またはトレオニン残基をアラニンと置換し、他の残りの配列は同一であった。GesimのNanoPlotterを使用してのせた。スポット間の距離は1mmであり、20%グリセリン含有100mM PBS緩衝液(pH7.8)を含むペプチド溶液を、スポットあたり0.8nLのせた。ペプチドアセンブリを、図8Aに示す。ここでは、黒丸はセリンまたはトレオニンを含む潜在的基質ペプチドを示し、白丸は対照ペプチドを示す。ガラス表面に3つの同一のサブアレイをのせた。スポット数を、図8Cで認めることができ、使用したペプチド配列は実施例18から得られる。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を含む10mLの100μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面を第2のガラス表面で覆い、プロテインキナーゼC(10U/mL)を、ATP/γ³²P-ATP混合物(100μM/mL、100μCi/mL)と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25℃で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した(実施例38)。得られた写真を、図8Bに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼCによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図8Dに示す。プロテインキナーゼC基質として公知のペプチド(基質ペプチド番号3、23、27、41、43)およびプロテインキナーゼC基質として記載されていない他のペプチドが認識され、修飾ガラス表面上でこのキナーゼによってリン酸化されることが明らかである。したがって、このようなアセンブリはキナーゼ(例えば、プロテインキナーゼCなど)の基質特異性の特徴付けに適切であることが明らかである。

【0080】

図9 それぞれN末端をジペプチドのシステイニル-β-アラニンで修飾した正確に43個のセリンおよび/またはトレオニン含有ペプチド(潜在的なキナーゼの基質ペプチド)ならびに対応する対照ペプチドを、マイケル付加によってマレイニミド官能基化ガラス表面に結合させた(実施例18)。対照ペプチドでは、セリンおよび/またはトレオニン残基をアラニンと置換し、他の残りの配列は同一であった。GesimのNanoPlotterを使用してのせた。スポット間の距離は1mmであり、20%グリセリン含有100mM PBS緩衝液(pH7.8)を含むペプチド溶液を、スポットあたり0.8nLのせた。ペプチドアセンブリを、図9Aに示す。ここでは、黒丸はセリンまたはトレオニンを含む潜在的基質ペプチドを示し、白丸は対照ペプチドを示す。ガラス表面に3つの同一のサブアレイをのせた。スポット数を、図9Cで認めることができ、使用したペプチド配列は実施例18から得られる。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を含む10mLの100μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面を第2のガラス表面で覆い、プロテインキナーゼA(10U/mL)を、ATP/γ³²P-ATP混合物(100μM/mL、100μCi/mL)と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25℃で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した(実施例39)。得られた写真を、図9Bに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼAによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図9Dに示す。1つの例外を含むが、修飾ガラス表面上の全ペプチドが-2位および-3位(N末端)の2つのアルギニン残基をセリンに運ぶプロテインキナーゼAによって認識およびリン酸化されることが明らかである。配列モチーフRRxSを、プロテインキナーゼAの好ましい基質モチーフとして記載する(A. Kreegipuu, N. Blom, S. Brunak, J. Jarv, 1998, 「Statistical analysis of protein kinase specificity determinants」、FEBS Lett., 430, 45~50)。基質モチーフの過剰

なN末端の局在化によりペプチド83はおそらくリン酸化されない。したがって、このようなアセンブリはキナーゼ（例えば、プロテインキナーゼAなど）の基質特異性の特徴付けに適切であることが明らかである。

【0081】

図10 それぞれN末端をジペプチドのアミノオキシ酢酸β-アラニンで修飾した正確に79個のペプチドを、マイケル付加によってアルデヒド官能基化ガラス表面に結合させた（実施例20）。GesimのNanoPlotterを使用してのせた。スポット間の距離は1.5mmであり、DMSOを含むペプチド溶液を、スポットあたり1nLのせた。13量体ペプチドをそれぞれ11アミノ酸残基と重ね、これらはMBPの一次構造を完全に網羅し、これらは共にbos taurus由来のミエリン塩基性タンパク質（MBP）（SWISSPROTアクセッション番号P02687）を介したスキャンを形成する。MBPの一次構造を図10Cに示す。太字で示した残基について、プロテインキナーゼAによるリン酸化は先行技術に記載されている（A. Kishimoto, K. Nishiyama, H. Nakanishi, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama, Y. Nishizuka, 1985, 「Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase」、J. Biol. Chem., 260, 12492~12499）。スキャン中の13量体ペプチドは、2つのアミノ酸配列のシフトを示す。ペプチドアセンブリを図10Bに示す。したがって、ペプチド番号1はMBPの一次構造の1~13のアミノ酸配列を示し、ペプチド番号2はMBPの一次構造の3~15アミノ酸残基を示す。ガラス表面に3つの同一のサブアレイをのせた。これらのサブアレイの1つを図10Aに示す。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10mLの100μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼA（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100μM/mL、100μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した（実施例40を参照のこと）。25で30分間のインキュベーション後、対応するペプチドのリン酸化を、FUJIFILM PhosphorImagerを使用して検出した。得られた写真を、図10Aに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼAによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図10Dに示す。修飾ガラス表面上のほとんどのペプチドが溶液中で行われた実験でも見出されたプロテインキナーゼAによって認識およびリン酸化されることが明らかである（A. Kishimoto, K. Nishiyama, H. Nakanishi, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama, Y. Nishizuka, 1985, 「Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase」、J. Biol. Chem., 260, 12492~12499）。

【0082】

図11 先行技術の種々の化学的選択反応の概要を示す：A）アルデヒド（R⁴=H）またはケトン（R⁴がHではない）とアミノオキシ化合物が反応してオキシムが生成する、B）、アルデヒド（R⁴=H）またはケトン（R⁴がHではない）とチオセミカルバジドが反応してチオセミカルボソンが生成する、C）アルデヒド（R⁴=H）またはケトン（R⁴がHではない）とヒドラジドが反応してヒドラゾンが生成する、D）アルデヒド（R⁴=H）またはケトン（R⁴がHではない）と1,2-アミノチオールが反応してチアゾリン（X=S）が生成されるか1,2-アミノアルコールが反応してオキサゾリン（X=O）が生成するか、1,2-ジアミンが反応してイミダゾリン（X=NH）が生成する、E）チオカルボキシレートとα-ハロカルボニルが反応してチオエステルが生成される、F）チオエステルとβ-アミノチオールが反応してβ-メルカプトアミドが生成する、F）メルカプタンとマレイニミドが反応してスクシンイミドが生成される。この場合、ラジカルR¹は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、もしくはアリールラジカルまたは複素環式化合物もしくは表面を示し、ラジカルR⁴~R⁶は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、もしくはアリールラジカル、または複素環式化合物もしくは表面、H、D、もしくはTを示し、アルキルは分岐および非分岐C₁~₂₀アルキル、C₃~₂₀シクロアルキル、好ましくは分岐および非分岐C₁~₁₂アルキル、C₃~₁₂シクロアルキル、特に好ましくは分岐および非分岐C₁~₆アルキル、C

$3 \sim 6$ シクロアルキル残基を示す。アルケニルは、分岐および非分岐 $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 20$ アルキル-O- $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、 $C_1 \sim 20$ (-O/S- $C_2 \sim 20$) $2 \sim 20$ アルケニルラジカル、アリール $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐ヘテロシクリル $C_2 \sim 20$ アルケニルラジカル、 $C_3 \sim 20$ シクロアルケニルラジカル、好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 12$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 12$ (-O/S- $C_2 \sim 12$) $2 \sim 12$ アルケニルラジカル、特に好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 6$ アルケニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 6$ (-O/S- $C_2 \sim 8$) $2 \sim 8$ アルケニルラジカルを示し、アルキニルは、分岐および非分岐 $C_2 \sim 20$ アルキニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 20$ (-O/S- $C_2 \sim 20$) $2 \sim 20$ アルキニルラジカル、好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 12$ アルキニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 12$ (-O/S- $C_2 \sim 12$) $2 \sim 12$ アルキニルラジカル、特に好ましくは分岐および非分岐 $C_2 \sim 6$ アルキニルラジカル、分岐および非分岐 $C_1 \sim 6$ (-O/S- $C_2 \sim 8$) $2 \sim 8$ アルキニルラジカルを示し、シクロアルキルは、架橋および非架橋 $C_3 \sim 40$ シクロアルキルラジカル、好ましくは架橋および非架橋 $C_3 \sim 26$ シクロアルキルラジカル、特に好ましくは架橋および非架橋 $C_3 \sim 15$ シクロアルキルラジカルを示し、アリールは、置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アズレニル、アントラセニル、インダセニル、アセナフチル、フルオレニル、フェナレニル、フェナントレニルラジカル、好ましくは置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アズレニル、アントラセニル、インデニル、インダセニル、アセナフチル、フルオレニルラジカル、特に好ましくは置換および非置換単結合または多結合フェニル、ペンタレニル、アントラセニルラジカル、ならびにその部分的水和誘導体を示す。複素環式化合物は、1~7個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の3~15員環の単環系、二環系、および三環系、好ましくは1~5個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の3~10員環の単環系、二環系、および三環系、特に好ましくは1~3個のヘテロ原子を有する不飽和および飽和の5、6、および10員環の単環系、二環系、および三環系であり得る。

【0083】

さらに、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロ原子、複素環式化合物、生体分子または天然物質では、以下の置換基の0~30個（好ましくは、0~10個、特に好ましくは0~5個）が単独で存在するか互いに組み合わせることができる。フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、水酸基、アミド、エステル、酸、アミン、アセタール、ケタール、チオール、エーテル、リン酸塩、硫酸塩、スルホキシド、過酸化物、スルホン酸、チオエーテル、ニトリル、尿素、カルバメートであり、フッ素、塩素、臭素、水酸基、アミド、エステル、酸、アミン、エーテル、リン酸塩、硫酸塩、スルホキシド、チオエーテル、ニトリル、尿素、カルバメートが好ましく、塩素、水酸基、アミド、エステル、酸、エーテル、ニトリルが特に好ましい。

【0084】

図12 固定状態の1つまたは複数の化合物についての所与の条件下で分子量を増減することができる作用因子（酵素活性C）を含む支持体表面上の化合物アセンブリ（ $B_1 \sim B_5$ ）のインキュベーションの種々の態様の略図を示す。表面と固定化合物（A）との間の結合は、共有結合であり且つ部位選択性であるべきである。図Aは、作用因子Cを表面にのせた態様である。図Bは、同一または異なる固定化合物のアンサンブルのいずれかを含むことができる互いに対面した2つの表面の間に作用因子Cをのせた態様を示す。

【0085】

以下の実施例は、その表面が固定用表面を必要とするガラスの官能基化（実施例1~14）、表面上に反応基が得られる種々のペプチドの固定化（実施例15~24）、および本発明の固定化ペプチドを使用したキナーゼ媒介ペプチド修飾分析（実施例25~34）に関する。以下に列挙した略語を使用する。

Ala、A	L-アラニン
Aoa、O	アミノオキシ酢酸
Arg、R	L-アルギニン
Asn、N	L-アスパラギン

10

20

30

40

50

Asp、D	L-アスパラギン酸	
ATP	アデノシン-5'-三リン酸	
β Ala、B、BAL	β -アラニン、3-アミノプロピオン酸	
Boc	三級ブトキシカルボニル	
Cit	L-シトルリン	
Cys、C	L-システイン	
DCM	ジクロロメタン	
DIC	N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド	
DIPEA	N,N'-ジイソプロピルエチルアミン	
DMF	N,N'-ジメチルホルムアミド	10
DMF	N,N'-ジメチルホルムアミド	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
EGTA	エチレンジグリコ-ビス-(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-四酢酸	
Et	エチル	
Fmoc	9-フルオレニルメトキシカルボニル	
Gln、Q	グルタミン	
Glu、E	L-グルタミン酸	
Gly、G	グリシン	
HBTU	O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート	20
His、H	L-ヒスチジン	
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	
Ile、I	L-イソロイシン	
L	リットル	
Leu、L	L-ロイシン	
Lys、K	L-リジン	
M	モル	
MBHA	メチルベンジドリルアミン	
MBP	ミエリン塩基性タンパク質	
MeOH	メタノール	30
Met、M	L-メチオニン	
mL	ミリリットル	
mM	ミリモル	
mRNA	伝令RNA	
nL	ナノリットル	
Phe、F	L-フェニルアラニン	
Pbf	2,2,4,6,7-ペンタメチル-ジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル	
Pro、P	L-プロリン	
PTFE	ポリテトラフルオロエチレン	
PVC	ポリビニルクロリド	40
PVDF	ポリビニルジフルオリド	
RNA	リボ核酸	
RP	逆相	
RT	室温	
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム	
Ser、S	L-セリン	
tBu	三級ブチル	
TFA	トリフルオロ酢酸	
THF	テトラヒドロフラン	
Thr、T	L-トレオニン	50

Tris 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール
 Trp、W L-トリプロファン
 Tween20 ポリオキシエチレン-ソルビタン-モノラウレート (商標Atlas Chemie)
 Tyr、Y L-チロシン
 U 単位
 Val、V L-バリン

【0086】

以下の試薬および溶媒を使用した。

プロミン、tert-ブチルメチルエーテル、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド、N,N-ジイソプロピルエチルアミン無水酢酸、グリセリン、尿素、40%ヒドロキサミン溶液、ピペリジン、トリエチルアミン、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、N,N-ジメチルホルムアミド、エタノール、メタノール、およびテトラヒドロフランは、Merck Eurolab (Darmstadt, Germany) 製である。塩化オキサリル、チオシアン酸ナトリウム、トリフルオロ酢酸、ジメチルスルホキシド、チオアセトアミド、Lawessons試薬、ギ酸、およびチオ尿素を、Fluka (Deisenhofen, Germany) から入手した。アデノシン-5'-トリホスフェート、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールヒドロクロリド、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、1,4-ジチオ-DL-スレイトール、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、およびエチレングリコールビス-(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-四酢酸は、Sigma (Taufkirchen, German) 製である。RinkアミドMBHA樹脂、(ベンズトリアゾール-1-イル)N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートおよびFmocアミノ酸ペンタフルオロフェニルエステルを、Novabiochem (Bad Soden, Germany) から入手した。Whatman50セルロースメンブレン (Whatman Maidstone, UK) を、SPOT合成に使用した。

【0087】

クロマトグラフィーおよび物理データ：

ESI-MS (Finnigan LCQイオントラップ質量分析計) を接続したHewlett Packardシリーズ1100システム (G1322A脱気装置、G1311A4ポンプ、G1313A自動サンプラー、G1316Aサーモスタット制御カラムボックス、G1314波長可燃UV検出器) を使用してRP-18-HPLC-MS分析を行った。RP-18-カラム材 (プレカラム付きのVydac 218 TP5215、2.1×150mm、5μm、C18、300A) を使用し、30 で全クロマトグラムでリニアグラジエント (Bを5~95%で25分間、A:0.05%TFA水溶液、B:0.05%TFAのCH₃CN溶液) を使用して0.3mL/分の流速で分離した。λ = 220nmでUV検出を行った。

【0088】

Merck Eurolabカラム (LiChrospher 100、RP18、10×250mm) を使用したMerck/Hitachiシステム (L-6250 4ポンプ、L-/400波長可変UV検出器、D-7000インターフェース、ソフトウェア: HPLC Systemmanager D-7000 for NT4.0) を使用して、溶媒流速6.0mL/分で分離HPLCを行った。使用した溶媒系は、成分A (H₂O/0.1体積%TFA) およびB (CH₃CN/0.1体積%TFA) を含んでいた。

【0089】

可溶性ペプチド生成用装置：

固定化に使用したペプチドを、RinkアミドMBHA樹脂に対する標準的なFmocプロトコールを使用し、「Syro」並列自動合成システム (MultiSynTech, Witten, Germany) を使用したC末端ペプチドアミドから合成した。樹脂からの切断および全保護基の分離後、得られた全ペプチドを、HPLC-MSを使用して分析し、所望の分子イオンシグナルを示した。その後のHPLC精製後、ペプチドを凍結乾燥し、-20 で保存した。

【0090】

固定化に使用したペプチド (タンパク質MBP、カゼイン、ヒストンH1の13量体ペプチド) を、Autospot XLバージョン2.02制御ソフトウェアを使用したAutospot AMS 222 (Abimed, Langenfeld, Germany) を使用した標準的SPOT合成法を使用して自動的に生成した。ステンレススチール皿 (Merck Eurolab) 中で洗浄し、傾斜台に移した。

【 0 0 9 1 】

実施例

実施例1：アミノプロピルシリル化ガラス表面のマレイニミド官能化

4-マレイニミド酪酸 (Fluka、63174) を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のジイソプロピルカルボジイミド (DIC) の添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面 (2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep (商標)、S4651) に得られたマレイニミド酪酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのジクロロメタン (DCM) 洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

10

【 0 0 9 2 】

実施例2：ポリリジン修飾ガラス表面のマレイニミド官能基化

6-マレイニミドカプロン酸 (Fluka、63176) を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したポリリジン修飾ガラス表面 (Sigma、Poly-Prep (商標)、P0425、2.5×7.5cm) を得られたマレイニミドカプロン酸無水溶液と室温で3時間インキュベートした。この場合、60 μLのこの溶液を、毛管力によって2つの修飾ガラス表面のいずれかの上にのせた。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

20

【 0 0 9 3 】

実施例3：アミノプロピルシリル化ガラス表面のアルデヒド官能基化

4-カルボキシベンズアルデヒド (Fluka、21873) を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面 (2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep (商標)、S4651) に得られた活性化カルボキシベンズアルデヒド溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【 0 0 9 4 】

実施例4：アミノプロピルシリル化ガラス表面のケトン官能基化

レブリン酸 (Fluka、61380) を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面 (2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep (商標)、S4651) に得られたレブリン酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

30

【 0 0 9 5 】

実施例5：アミノプロピルシリル化ガラス表面のプロモアセチル化

プロモ酢酸を、0.4M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面 (2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep (商標)、S4651) に得られたプロモ酢酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

40

【 0 0 9 6 】

実施例6：アミノプロピルシリル化ガラス表面の4-プロモメチル安息香酸官能基化

4-プロモメチル安息香酸を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面 (2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep (商標)、S4651) に得られた4-プロモメチ

50

ル安息香酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【0097】

実施例7：アミノプロピルシリル化ガラス表面のフェニルチオ尿素官能基化

4-カルボキシフェニルチオ尿素（Lancaster、13047）を、0.2M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面（2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に得られた活性化溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

10

【0098】

実施例8：アミノプロピルシリル化ガラス表面のチオアミド官能基化

コハク酸モノチオアミドを、0.2M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面（2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に得られた修飾コハク酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

20

【0099】

実施例9：アミノプロピルシリル化ガラス表面のプロモケトン官能基化

1,4-ジプロモ-2,3-ジケトブタン（Aldrich、D3,916-9）を、0.1%トリエチルアミンを含む0.2M DMFに溶解した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面（2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に得られた溶液をコートして、室温で7時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【0100】

実施例10：チオアミド修飾ガラス表面のプロモケトン官能基化

本実施例に示す構造を、高収率の簡単な表面修飾に使用することができる。

30

【0101】

コハク酸モノチオアミドと反応させたアミノプロピルシリル化ガラス表面（2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）（実施例8を参照のこと）に0.1M 1,4-ジプロモ-2,3-ジケトブタン（Aldrich、D3,916-9）のエタノール溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのエタノール洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【0102】

実施例11：フェニルチオ尿素修飾ガラス表面のプロモケトン官能基化

本実施例に示す構造を、高収率の簡単な表面修飾に使用することができる。

40

【0103】

4-カルボキシフェニルチオ尿素と反応させたアミノプロピルシリル化ガラス表面（2.5×7.5cm、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に0.1M 1,4-ジプロモ-2,3-ジケトブタンのエタノール溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのエタノール洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【0104】

50

実施例12：アミノプロピルシリル化ガラス表面のプロモピロラセミ酸官能基化

これらの表面修飾は、非常に小さな構造を使用した場合でさえも、アミノ官能基化ガラス表面をプロモケトン官能基化ガラス表面に変換することができることを示す。この場合、プロモピロラセミ酸は、アミド結合に必要なカルボキシル官能基およびその後の生体分子の固定に必要な α プロモケトン官能基の両方を含む最も小さな可能な化合物である。

【0105】

塩化オキサリルを使用して、ピルビン酸ナトリウムを対応する酸塩化物に変換した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面（ $2.5 \times 7.5\text{cm}$ 、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に得られた溶液をコートして、室温で5時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのメタノールおよびDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させた。得られたピロラセミ酸修飾ガラス表面を、0.1mLの臭素を含む10mL無水酢酸溶液との1時間の処理によってプロモピロラセミ酸修飾ガラス表面に変換した。各回が室温で3分間の30mLのメタノールおよびDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

10

【0106】

実施例13：アミノプロピルシリル化ガラス表面のプロモアセトフェノン官能基化

4-アセチル安息香酸を、0.3M DMFに溶解した。得られた混合物を、室温で15分間の0.5当量のDICの添加によって活性化した。圧縮空気で浄化したアミノプロピルシリル化ガラス表面（ $2.5 \times 7.5\text{cm}$ 、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）に得られた4-アセチル安息香酸無水溶液をコートして、室温で3時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのDMF洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのメタノールおよびDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させた。このようにして修飾したガラス表面を、0.1mLの臭素を含む10mLの無水酢酸溶液との1時間の処理によってプロモアセトフェノン酸修飾ガラス表面に変換した。各回が室温で3分間の30mLのメタノールおよびDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

20

【0107】

実施例14：アミノプロピルシリル化ガラス表面のチオシアナト-アセトフェノン官能基化

プロモアセトフェノン修飾アミノプロピルシリル化ガラス表面（ $2.5 \times 7.5\text{cm}$ 、Sigma、Silane-Prep（商標）、S4651）（実施例13を参照のこと）に0.1M チオシアナトナトリウムのエタノール溶液をコートして、50 で5時間インキュベートした。このようにして処理したガラス表面を、各回が室温で3分間の30mLのエタノール洗浄を5回行った。各回が室温で3分間の30mLのDCM洗浄を3回行った後、ガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

30

【0108】

実施例15：マレイニミド官能基化ガラス表面上へのシステイン含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチドを、C末端ペプチドアミドとして固相での標準的なFmocベースの化学的方法によって合成した。この場合、相当するように保護したFmocアミノ酸を1当量のHBTUおよび3当量のジイソプロピルエチルアミンのDMF溶液で活性化し、DMF中でRinkアミドMBHA樹脂に結合させた。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で30分間使用してFmoc保護基の切断を行った。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸についてはtBu；リジンについてはBoc；アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジンについてはトリチル；アルギニンについてはPbf）の切断およびポリマーからの同時分離を行った。得られた混合物を濾過し、濾過物をtert-ブチルメチルエーテルによって沈殿させた。沈殿物を分離し、アセトニトリル/水混合物（0.1%トリフルオロ酢酸）を使用したRP18材料でのHPLCを使用して精製した。所望の生成物を含む画分を凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20 で保存した。

40

50

【 0 1 0 9 】

b) HPLC精製システイン含有ペプチドを、200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) 中に溶解した (最終ペプチド濃度: 10mM)。次いで、この溶液の各1 μ Lを、室温でエッペンドルフピペットを使用してマレイニミド官能基化ガラス表面 (実施例1を参照のこと) にスポットし、これをほぼ水に飽和した環境下にて室温で1時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの300mMメルカプトエタノールの200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) とインキュベートして、残存マレイニミド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

10

【 0 1 1 0 】

実施例16: プロモアセチル化ガラス表面上へのシステイン含有ペプチドの固定化

HPLC精製システイン含有ペプチドを、200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) 中に溶解した (最終ペプチド濃度: 5mM)。次いで、この溶液の各1 μ Lを、室温でエッペンドルフピペットを使用して官能基化ガラス表面 (実施例5を参照のこと) にスポットし、これをほぼ水に飽和した環境下にて室温で1時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの300mMメルカプトエタノールの200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) とインキュベートして、残存マレイニミド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

20

【 0 1 1 1 】

実施例17: アルデヒド官能化ガラス表面上へのシステイン含有ペプチドの固定化

精製システイン含有ペプチドを、200mM トリスカルボキシエチルホスフィンを含む200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中に溶解した (最終ペプチド濃度: 5mM)。次いで、この溶液の各1 μ Lを、室温でエッペンドルフピペットを使用してアルデヒド官能基化ガラス表面 (実施例3を参照のこと) にスポットし、これをほぼ水に飽和した環境下にて室温で4時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を室温で30分間の30mLの40% ヒドロキシアミン水溶液とインキュベートして、残存アルデヒド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

30

【 0 1 1 2 】

実施例18: マレイニミド官能化ガラス表面上へのシステイン含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド (43個のセリン/トレオニン含有ペプチドおよび対応する43個の対照ペプチド) を、C末端ペプチドアミドとしてセルロースでの標準的なSPOT合成方法 (R. Frank, Tetrahedron, 48, 1992, 9217~9232頁, A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻, 「Combinatorial Peptide Library Protocols」, 25~39頁, S. Cabilly編, Humana Press Inc., Totowa, NJ) によって合成した。この場合、相当するように保護したFmocアミノ酸ペンタフルオロフェニルエステルをDMFに溶解し、1 μ Lを一度にスポットした。同時に室温で25分間でカップリング反応が2度起こった。20% ピペリジンのDMF溶液を室温で20分間使用してFmoc保護基の切断を行った。97% トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基 (セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸についてはtBu; リジンについてはBoc; アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジンについてはトリチル; アルギニンについてはPbf) の切断を行った。セルロース結合ペプチドをDCM、MeOH、およびジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥させた。室温で24時間アンモニアガスを使用してセルロースからペプチドを切断した。物理的に吸着したペプチドを含むスポットを打ち抜き、96ウェルマイクロタイタープレートに移した。それぞれ超音波条件下での200 μ Lの

40

50

20% メタノールを使用してペプチドを分離後、サンプルを濾過し、384ウェルマイクロタ
イタープレートに移し、凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20 で保存した。以下のリス
トは、合成ペプチド配列の概要を示すと同時に、図8および9に記載のペプチド番号を対応
する配列に割り当てている（BAI = β -アラニン）。

- 1 Cys-BAI-Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Thr-Val-Asp-Ala-Leu-NH₂
- 2 Cys-BAI-Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu-NH₂
- 3 Cys-BAI-Ala-Lys-Arg-Arg-Arg-Leu-Ser-Ser-Leu-Arg-Ala-NH₂
- 4 Cys-BAI-Ala-Lys-Arg-Arg-Arg-Leu-Ala-Ala-Leu-Arg-Ala-NH₂ 10
- 5 Cys-BAI-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ser-Ile-NH₂
- 6 Cys-BAI-Gly-Arg-Ala-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-NH₂
- 7 Cys-BAI-Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Arg-NH₂
- 8 Cys-BAI-Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Ala-Ile-Ala-Arg-Arg-NH₂
- 9 Cys-BAI-Glu-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Phe-Arg-NH₂
- 10 Cys-BAI-Glu-Arg-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Phe-Arg-NH₂
- 11 Cys-BAI-Gly-Arg-Pro-Arg-Thr-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-Gly-NH₂ 20
- 12 Cys-BAI-Gly-Arg-Pro-Arg-Ala-Ala-Ala-Phe-Ala-Glu-Gly-NH₂
- 13 Cys-BAI-Lys-Lys-Lys-Ala-Leu-Ser-Arg-Gln-Leu-Ser-Val-Ala-Ala-NH₂
- 14 Cys-BAI-Lys-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Ala-Ala-NH₂
- 15 Cys-BAI-Lys-Lys-Leu-Asn-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ala-NH₂
- 16 Cys-BAI-Lys-Lys-Leu-Asn-Arg-Ala-Leu-Ala-Val-Ala-NH₂
- 17 Cys-BAI-Lys-Arg-Gln-Gln-Ser-Phe-Asp-Leu-Phe-NH₂
- 18 Cys-BAI-Lys-Arg-Gln-Gln-Ala-Phe-Asp-Leu-Phe-NH₂
- 19 Cys-BAI-Lys-Arg-Arg-Glu-Ile-Leu-Ser-Arg-Arg-Pro-Ser-Tyr-Arg-NH₂ 30
- 20 Cys-BAI-Lys-Arg-Arg-Glu-Ile-Leu-Ala-Arg-Arg-Pro-Ala-Phe-Arg-NH₂
- 21 Cys-BAI-Leu-Arg-Ala-Pro-Ser-Trp-Ile-Asp-Thr-NH₂
- 22 Cys-BAI-Leu-Arg-Ala-Pro-Ala-Trp-Ile-Asp-Ala-NH₂
- 23 Cys-BAI-Pro-Leu-Ser-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-NH₂
- 24 Cys-BAI-Pro-Leu-Ala-Arg-Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-NH₂
- 25 Cys-BAI-Pro-Leu-Ser-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ser-Ser-NH₂

- 26 Cys-BAl-Pro-Leu-Ala-Arg-Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Ala-NH₂
27 Cys-BAl-Gln-Lys-Arg-Pro-Ser-Gln-Arg-Ser-Lys-Tyr-Leu-NH₂
28 Cys-BAl-Gln-Lys-Arg-Pro-Ala-Gln-Arg-Ala-Lys-Phe-Leu-NH₂
29 Cys-BAl-Arg-Lys-Ile-Ser-Ala-Ser-Glu-Phe-NH₂
30 Cys-BAl-Arg-Lys-Ile-Ala-Ala-Ala-Glu-Phe-NH₂
31 Pro-Lys-Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-BAl-Cys-NH₂
32 Pro-Lys-Ala-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-BAl-Cys-NH₂ 10
33 Cys-BAl-Arg-Pro-Arg-Ala-Ala-Thr-Phe-NH₂
34 Cys-BAl-Arg-Pro-Arg-Ala-Ala-Ala-Phe-NH₂
35 Cys-BAl-Arg-Arg-Arg-Ala-Pro-Leu-Ser-Pro-NH₂
36 Cys-BAl-Arg-Arg-Arg-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-NH₂
37 Cys-BAl-Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu-NH₂
38 Cys-BAl-Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Ala-Glu-Glu-Glu-NH₂
39 Cys-BAl-Met-His-Arg-Gln-Glu-Thr-Val-Asp-Cys-Leu-Lys-NH₂
40 Cys-BAl-Met-His-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Cys-Leu-Lys-NH₂ 20
41 Cys-BAl-Lys-Lys-Arg-Phe-Ser-Phe-Lys-Lys-Ser-Phe-Lys-Leu-NH₂
42 Cys-BAl-Lys-Lys-Arg-Phe-Ala-Phe-Lys-Lys-Ala-Phe-Lys-Leu-NH₂
43 Cys-BAl-Pro-Lys-Asp-Pro-Ser-Gln-Arg-Arg-Arg-NH₂
44 Cys-BAl-Pro-Lys-Asp-Pro-Ala-Gln-Arg-Arg-Arg-NH₂
45 Cys-BAl-Ile-Ala-Ala-Asp-Ser-Glu-Ala-Glu-Gln-NH₂
46 Cys-BAl-Ile-Ala-Ala-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Gln-NH₂
47 Cys-BAl-Ser-Pro-Ala-Leu-Thr-Gly-Asp-Glu-Ala-NH₂
48 Cys-BAl-Ala-Pro-Ala-Leu-Ala-Gly-Asp-Glu-Ala-NH₂ 30
49 Cys-BAl-Gly-Arg-Ile-Leu-Thr-Leu-Pro-Arg-Ser-NH₂
50 Cys-BAl-Gly-Arg-Ile-Leu-Ala-Leu-Pro-Arg-Ala-NH₂
51 Cys-BAl-Met-Gly-Glu-Ala-Ser-Gly-Cys-Gln-Leu-NH₂
52 Cys-BAl-Met-Gly-Glu-Ala-Ala-Gly-Cys-Gln-Leu-NH₂
53 Cys-BAl-Glu-Glu-Thr-Pro-Tyr-Ser-Tyr-Pro-Thr-NH₂
54 Cys-BAl-Glu-Glu-Ala-Pro-Phe-Ser-Phe-Pro-Ala-NH₂
55 Cys-BAl-Gly-Asn-His-Thr-Tyr-Gln-Glu-Ile-Ala-NH₂ 40
56 Cys-BAl-Gly-Asn-His-Ala-Phe-Gln-Glu-Ile-Ala-NH₂
57 Leu-Arg-Ser-Pro-Ser-Trp-Glu-Pro-Phe-BAl-Cys-NH₂
58 Leu-Arg-Ala-Pro-Ala-Trp-Glu-Pro-Phe-BAl-Cys-NH₂
59 Ser-Ser-Pro-Val-Tyr-Gln-Asp-Ala-Val-BAl-Cys-NH₂

- 60 Ala-Ala-Pro-Val-Phe-Gln-Asp-Ala-Val-BAl-Cys-NH₂
- 61 Cys-BAl-Ser-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ser-Ser-Leu-NH₂
- 62 Cys-BAl-Ala-Arg-Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Ala-Leu-NH₂
- 63 Leu-Ser-Val-Ser-Ser-Leu-Pro-Gly-Leu-BAl-Cys-NH₂
- 64 Leu-Ser-Val-Ala-Ala-Leu-Pro-Gly-Leu-BAl-Cys-NH₂
- 65 Cys-BAl-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂
- 66 Cys-BAl-Val-Ala-Pro-Arg-Ala-Pro-Pro-Pro-Ala-NH₂ 10
- 67 Cys-BAl-Arg-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val-NH₂
- 68 Cys-BAl-Arg-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val-NH₂
- 69 Cys-BAl-Pro-Arg-Pro-Ala-Ser-Val-Pro-Pro-Ser-NH₂
- 70 Cys-BAl-Pro-Arg-Pro-Ala-Ser-Ala-Val-Pro-Pro-Ala-NH₂
- 71 Cys-BAl-Arg-Glu-Ala-Arg-Ser-Arg-Ala-Ser-Thr-NH₂
- 72 Cys-BAl-Arg-Glu-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-NH₂
- 73 Gln-Ser-Tyr-Ser-Ser-Ser-Gln-Arg-Val-BAl-Cys-NH₂ 20
- 74 Gln-Ser-Tyr-Ala-Ala-Ala-Gln-Arg-Val-BAl-Cys-NH₂
- 75 Cys-BAl-Gly-Gly-Gly-Thr-Ser-Pro-Val-Phe-Pro-NH₂
- 76 Cys-BAl-Gly-Gly-Gly-Ala-Ala-Pro-Val-Phe-Pro-NH₂
- 77 Leu-Tyr-Ser-Ser-Ser-Pro-Gly-Gly-Ala-BAl-Cys-NH₂
- 78 Leu-Tyr-Ala-Ala-Ala-Pro-Gly-Gly-Ala-BAl-Cys-NH₂
- 79 Cys-BAl-Asp-Leu-Pro-Leu-Ser-Pro-Ser-Ala-Phe-NH₂
- 80 Cys-BAl-Asp-Leu-Pro-Leu-Ala-Pro-Ala-Ala-Phe-NH₂
- 81 Cys-BAl-Thr-Thr-Pro-Leu-Ser-Pro-Thr-Arg-Leu-NH₂ 30
- 82 Cys-BAl-Ala-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-Ala-Arg-Leu-NH₂
- 83 Arg-Arg-Ile-Ser-Lys-Asp-Asn-Pro-Asp-Tyr-Gln-Gln-Asp-BAl-Cys-NH₂
- 84 Arg-Arg-Ile-Ala-Lys-Asp-Asn-Pro-Asp-Tyr-Gln-Gln-Asp-BAl-Cys-NH₂
- 85 Cys-BAl-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂
- 86 Cys-BAl-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂

【 0 1 1 3 】

40

b) マイクロタイタープレート中のシステイン含有ペプチドを、GesimのNanoPlotterを使用してマレイニミド官能基化ガラス表面にのせた(実施例1参照)。スポット間の距離は1mmであった。20%グリセリン含有100mM PBS緩衝液(pH7.8)を含むペプチド溶液を、スポットあたり0.8nLのせ、このアセンブリを室温で4時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの300mMメルカプトエタノールの200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)とインキュベートして、残存マレイニミド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【 0 1 1 4 】

50

実施例19：アルデヒド官能化ガラス表面上へのアントラニロイルペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド（いずれの場合にも、タンパク質MBP、カゼイン、およびヒストンH1の全一次構造を示す13量体ペプチド）を、C末端ペプチドアミドとしてセルロースでの標準的なSPOT合成方法（R. Frank, Tetrahedron, 48, 1992, 9217～9232頁、A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻、「Combinatorial Peptide Library Protocols」、25～39頁、S. Cabilly編、Humana Press Inc., Totowa, NJ）によって合成した。この場合、相当するように保護したFmocアミノ酸ペンタフルオロフェニルエステルをDMFに溶解し、1 μ Lを一度にスポットした。同時に室温で25分間でカップリング反応が2度起こった。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で20分間使用してFmoc保護基の切断を行った。最後のFmoc切断後、セルロース結合ペプチドのN末端を、50 で5時間のIsatur酸のDMF飽和溶液を使用したインキュベーションにより、対応する2-アミノベンゾイル化誘導体に変換した。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸についてはtBu；リジンについてはBoc；アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジンについてはトリチル；アルギニンについてはPbf）の切断を行った。セルロース結合ペプチドをDCM、MeOH、およびジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥させた。室温で24時間アンモニアガスを使用してセルロースからペプチドを切断した。物理的に吸着したペプチドを含むスポットを打ち抜き、96ウェルマイクロタイタープレートに移した。それぞれ超音波条件下での200 μ Lの20%メタノールを使用してペプチドを分離後、サンプルを濾過し、384ウェルマイクロタイタープレートに移し、凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20 で保存した。

【0115】

b) マイクロタイタープレート中のアントラニロイルペプチドを、15容積%DMSOを含む200mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に溶解した（最終ペプチド濃度：0.5mM）。室温でGesimのNanoPlotterを使用して0.01 μ Lのこの溶液をアルデヒド修飾ガラス表面に一度にのせ（実施例3を参照のこと）、これを室温で4時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの40%ヒドロキシルアミン水溶液と室温で30分間インキュベートして、残存アルデヒド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

【0116】

実施例20：アルデヒド官能化ガラス表面上へのアミノオキシ酢酸含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド（いずれの場合にも、タンパク質MBP、カゼイン、およびヒストンH1の全一次構造を示す13量体ペプチド）を、C末端ペプチドアミドとしてセルロースでの標準的なSPOT合成方法（R. Frank, Tetrahedron, 48, 1992, 9217～9232頁、A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻、「Combinatorial Peptide Library Protocols」、25～39頁、S. Cabilly編、Humana Press Inc., Totowa, NJ）によって合成した。この場合、相当するように保護したFmocアミノ酸ペンタフルオロフェニルエステルをDMFに溶解し、1 μ Lを一度にスポットした。同時に室温で25分間でカップリング反応が2度起こった。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で20分間使用してFmoc保護基の切断を行った。Boc-アミノオキシ酢酸を使用してN末端をアシル化した。この目的で、1当量のHOAT/DICを使用してDMF中でこれを活性化した。その都度、1 μ Lのこの混合物を各セルロース結合ペプチド上にスポットし、室温で30分間放置した。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸についてはtBu；リジンについてはBoc；アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジンについてはトリチル；アルギニンについてはPbf）の切断を行った。セルロース結合ペプチドをDCM、MeOH、およびジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥させた。室温で24時間アンモニアガスを使用してセルロースからペプチドを切断した。物理的に吸着したペプチドを含むスポットを打ち抜き、96ウェルマ

マイクロタイタープレートに移した。それぞれ超音波条件下での200 μ Lの20%メタノールを使用してペプチドを分離後、サンプルを濾過し、384ウェルマイクロタイタープレートに移し、凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20 で保存した。

【0117】

b) マイクロタイタープレート中のアミノオキシ酢酸含有ペプチドを、DMSOに溶解した。室温でGesimのNanoPlotterを使用して1nLのこの溶液をアルデヒド修飾ガラス表面に一度にのせ（実施例3を参照のこと）、これを室温で4時間インキュベートした。この場合、スポット間の距離は1.5mmであった。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの40%ヒドロキシルアミン水溶液と室温で30分間インキュベートして、残存アルデヒド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

10

【0118】

実施例21：プロモアセチル化ガラス表面上へのアミノオキシ酢酸含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド（いずれの場合にも、タンパク質MBP、カゼイン、およびヒストンH1の全一次構造を示す13量体ペプチド）を、C末端ペプチドアミドとしてセルロースでの標準的なSPOT合成方法（R. Frank, Tetrahedron, 48, 1992, 9217~9232頁、A. Kramer and J. Schneider-Mergener, Methods in Molecular Biology, 第87巻、「Combinatorial Peptide Library Protocols」、25~39頁、S. Cabilly編、Humana Press Inc., Totowa, NJ）によって合成した。この場合、相当するように保護したFmocアミノ酸ペンタフルオロフェニルエステルをDMFに溶解し、1 μ Lを一度にスポットした。同時に室温で25分間でカップリング反応が2度起こった。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で20分間使用してFmoc保護基の切断を行った。Boc-アミノオキシ酢酸を使用してN末端をアシル化した。この目的で、1当量のHOAT/DICを使用してDMF中でこれを活性化した。その都度、1 μ Lのこの混合物を各セルロース結合ペプチド上にスポットし、室温で30分間放置した。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸についてはtBu；リジンについてはBoc；アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジンについてはトリチル；アルギニンについてはPbf）の切断を行った。セルロース結合ペプチドをDCM、MeOH、およびジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥させた。室温で24時間アンモニアガスを使用してセルロースからペプチドを切断した。物理的に吸着したペプチドを含むスポットを打ち抜き、96ウェルマイクロタイタープレートに移した。それぞれ超音波条件下での200 μ Lの20%メタノールを使用してペプチドを分離後、サンプルを濾過し、384ウェルマイクロタイタープレートに移し、凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20 で保存した。

20

30

【0119】

b) マイクロタイタープレート中のアミノオキシ酢酸含有ペプチドを、25体積%グリセリンを含む200mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に溶解した（最終ペプチド濃度：0.5mM）。室温でGesimのNanoPlotterを使用して0.01 μ Lのこの溶液をプロモアセチル化アミノ官能基化ガラス表面に一度にのせ（実施例5を参照のこと）、これを室温で4時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの300mMメルカプトエタノール溶液を含む200mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）とインキュベートして、残存プロモアセチル官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4 で保存した。

40

【0120】

実施例22：アルデヒド官能化ガラス表面上へのアミノオキシ酢酸含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド（Dpr（Aoa）-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂）を、C末端ペプチドアミドとして固相でのFmocベースの化学的標準方法によって合成した。この

50

場合、相当するように保護したFmocアミノ酸を1当量のHBTUおよび3当量のジイソプロピルエチルアミンのDMF溶液で活性化し、DMF中でRinkアミドMBHA樹脂に結合させた。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で30分間使用してFmoc保護基の切断を行った。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリンについてはtBu；アミノオキシ官能基についてはBoc；アルギニンについてはPbf）の切断およびポリマーからの同時分離を行った。得られた混合物を濾過し、濾過物をtert-ブチルメチルエーテルによって沈殿させた。沈殿物を分離し、アセトニトリル/水混合物（0.1%トリフルオロ酢酸）を使用したRP18材料でのHPLCを使用して精製した。所望の生成物を含む画分を凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20℃で保存した。

【0121】

b) ペプチドDpr (Aoa) -Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂を、25体積%のtert-ブタノールを含む200mM酢酸緩衝液（pH4.0）中に溶解した（最終ペプチド濃度：0.5mM）。次いで、室温でGesimのNanoPlotterを使用して5nLのこの溶液を20列×48ギャップ（全部で960スポット）のアセンブリ中のアルデヒド修飾ガラス表面（Telechem/ArrayIt、CSS-25ガラス支持体）に一度にのせた。この場合、スポット間の距離は1mmであった。このようにして処理したガラス表面を、室温で4時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの40%ヒドロキシルアミン水溶液と室温で30分間インキュベートして、残存アルデヒド官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4℃で保存した。

【0122】

実施例23：4-ブロモメチルベンゾイル化ガラス表面上へのシステイン含有ペプチドの固定化

HPLC精製したペプチドCys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂を、20体積%のグリセリンを含む200mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）中に溶解した（最終ペプチド濃度：2mM）。次いで、室温でGesimのNanoPlotterを使用して2nLのこの溶液を50列×120ギャップ（全部で6000スポット）のアセンブリ中のブロモメチル安息香酸官能基化ガラス表面（実施例6を参照のこと）に一度にのせた。この場合、スポット間の距離は0.4mmであった。このようにして処理したガラス表面を、室温で5時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの300mMのメルカプトエタノールを含む200mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）とインキュベートして、残存ブロモメチルフェニル官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4℃で保存した。

【0123】

実施例24：1-ブロモ-2,3-ジケト-ブタン官能化ガラス表面上へのチオアミド含有ペプチドの固定化

a) 固定化に使用したペプチド（Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-チオアミド）を、C末端ペプチドアミドとして固相でのFmocベースの化学的標準方法によって合成した。RinkアミドMBHA樹脂に結合したFmoc-Gly-OHを、THF中、Lawessons試薬を使用して還流下で3時間ボイルした。次いで、樹脂を、THFおよびDCMで洗浄し、DMFで1時間攪拌し、その後DMF、DCM、およびメタノールで洗浄した。50%モルホリンのDMF溶液を使用したFmoc保護基の除去後（40分間）、相当するように保護したFmocアミノ酸を1当量のHBTUおよび3当量のジイソプロピルエチルアミンのDMF溶液で活性化し、結合した。20%ピペリジンのDMF溶液を室温で30分間使用してFmoc保護基の切断を行った。97%トリフルオロ酢酸での室温で2時間の処理によって、不変の保護基（セリンについてはtBu；アルギニンについてはPbf）の切断およびポリマーからの同時分離を行った。得られた混合物を濾過し、濾過物をtert-ブチルメチルエーテルによって沈殿させた。沈殿物を分離し、アセトニトリル/水混合物（0.

1%トリフルオロ酢酸)を使用したRP18材料でのHPLCによって精製した。所望の生成物を含む画分を凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20℃で保存した。

【0124】

b) ペプチドLeu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-チオアミドを、50体積%のグリセリンを含む200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)中に溶解した(最終濃度:1mM)。次いで、室温でGesimのNanoPlotterを使用して1nLのこの溶液を70列×168ギャップ(全部で11760スポット)のアセンブリ中の1-ブロモ-2,3-ジケト-ブタン官能基化ガラス表面(実施例10を参照のこと)に一度にのせた。この場合、スポット間の距離は0.3mmであった。このようにして処理したガラス表面を2分間マイクロ波処理し、室温で3時間インキュベートした。各回が室温で100mLの蒸留水を使用する洗浄を3回行った後、修飾ガラス表面を30mLの3%チオアセトアミド水溶液と室温で30分間インキュベートして、残存α-ブロモケトン官能基を不活化した。次いで、ガラス表面を、各回が室温で3分間の50mLの水での洗浄を5回行い、その後各回が室温で3分間の50mLのメタノール洗浄を2回行った。このようにして処理したガラス表面を乾燥させ、さらなる使用まで4℃で保存した。

10

【0125】

実施例25: 修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析(図4を参照のこと)

Cys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂(共に未処理ペプチドおよび分離HPLC手段によって精製されたペプチドとして)および対照ペプチドCys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂で修飾したガラス表面(マレイニミド官能基化ガラス表面、実施例1を参照のこと)を、10mLの100μM ATPを含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA(pH7.5))と室温で10分間インキュベートした。次いで、プロテインキナーゼA(Sigma、P26452、U/mL)、100μM/mL ATP、および100μCi/mLのγ-³²P-ATP(Amersham、9.25mBq/250μCi/25μL、活性>5000Ci/mmol)の混合物を含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA(pH7.5))の1μLを、ペプチド修飾ガラス表面にスポットし、室温のほぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

20

洗浄緩衝液(1%SDSおよび1%Tween20を含む50mM TRIS緩衝液(pH7.5)、200mM NaCl)を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

30

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1%SDSを含む溶液を使用した50℃で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0126】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphor Imagerシステム(FLA-3000、FUJIFILM)を使用して決定した(図4を参照のこと)。

40

【0127】

実施例26: 修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析(図5を参照のこと)

ペプチド

Cys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂

および対照ペプチド

Cys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂

50

で修飾したガラス表面（マレイニミド官能基化ガラス表面、実施例1を参照のこと）を、10mLの100 μ M ATPを含むキナーゼ緩衝液（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA（pH7.5））と室温で10分間インキュベートした。ガラス表面を乾燥させ、ペプチド修飾ガラス表面上にカバーガラスを置いた。次いで、プロテインキナーゼA（Sigma、P26452、U/mL）、100 μ M/mL ATP、および100 μ Ci/mLの γ -³²P-ATP（Amersham、9.25mBq/250 μ Ci/25 μ L、活性>5000Ci/mmol）の混合物を含むキナーゼ緩衝液（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA（pH7.5））の20 μ Lを、毛管力によって修飾ガラス表面上に置いたカバーガラスによって形成されたギャップにのせた。室温のほぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下

10

のように洗浄した。
 洗浄緩衝液（1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液（pH7.5）、200mM NaCl）を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80% ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

20

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【 0 1 2 8 】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphorImagerシステム（FLA-3000、FUJIFILM）を使用して決定した（図5を参照のこと）。

【 0 1 2 9 】

実施例27：修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析（図7を参照のこと）

Dpr（Aoa）-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂で修飾したガラス表面（実施例22を参照のこと）を、10mLの100 μ M ATPを含むキナーゼ緩衝液（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA（pH7.5））と室温で10分間インキュベートした。ガラス表面を乾燥させ、同一直径の第2の非修飾ガラス表面をペプチド修飾ガラス表面上に置いた。次いで、プロテインキナーゼA（Sigma、P26452、U/mL）、100 μ M/mL ATP、および100 μ Ci/mLの γ -³²P-ATP（Amersham、9.25mBq/250 μ Ci/25 μ L、活性>5000Ci/mmol）の混合物を含むキナーゼ緩衝液（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA（pH7.5））の50 μ Lを、毛管力によって修飾ガラス表面上に置いた第2のガラス表面によって形成されたギャップにのせた。室温のほぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

30

洗浄緩衝液（1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液（pH7.5）、200mM NaCl）を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

40

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80% ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【 0 1 3 0 】

50

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量を Phosphor Imager システム (FLA-3000、FUJIFILM) を使用して決定した (図7を参照のこと)。

【0131】

実施例28：修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析 (図6を参照のこと)

Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-チオアミドで修飾したガラス表面 (実施例24を参照のこと) を、10mLの100 μ M ATPを含むキナーゼ緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5)) と室温で10分間インキュベートした。ガラス表面を乾燥させ、同一直径の第2の非修飾ガラス表面をペプチド修飾ガラス表面上に置いた。次いで、プロテインキナーゼA (Sigma、P26452、U/mL)、100 μ M/mL ATP、および100 μ Ci/mLの γ -³²P-ATP (Amersham、9.25mBq/250 μ Ci/25 μ L、活性>5000Ci/mmol) の混合物を含むキナーゼ緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5)) の50 μ Lを、毛管力によって修飾ガラス表面上に置いた第2のガラス表面によって形成されたギャップにのせた。室温のほぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

洗浄緩衝液 (1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液 (pH7.5)、200mM NaCl) を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80% ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0132】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量を Phosphor Imager システム (FLA-3000、FUJIFILM) を使用して決定した (図6を参照のこと)。

【0133】

実施例29：修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析 (図1を参照のこと)

ペプチド

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂, Cys- β Ala-Gln-Lys-Arg-Pro-Ser-Gln-Arg-Ser-Lys-NH₂,

および

Cys- β Ala-Arg-Arg-Lys-Asp-Leu-His-Asp-Glu-Glu-Asp-Glu-Ala-Met-Ser-Ile-Thr-Ala-NH₂

または対応する対照ペプチド

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂,
Cys- β Ala-Gln-Lys-Arg-Pro-Ala-Gln-Arg-Ala-Lys-NH₂,

および

Cys- β Ala-Arg-Arg-Lys-Asp-Leu-His-Asp-Asp-Glu-Glu-Asp-Glu-Ala-Met-Ala-Ile-Ala-Ala-NH₂

で修飾したガラス表面 (マレイニミド官能基化ガラス表面、実施例2を参照のこと) を、1

10

20

30

40

50

0mLの100 μ M ATPを含むキナーゼ緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM $MgCl_2$ 、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5)) と室温で10分間インキュベートした。次いで、

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂

および

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂

にはプロテインキナーゼA (プロテインキナーゼA、Sigma、P2645、1.67 μ g/mL)、

Cys- β Ala-Gln-Lys-Arg-Pro-Ser-Gln-Arg-Ser-Lys-NH₂

および

Cys- β Ala-Gln-Lys-Arg-Pro-Ala-Gln-Arg-Ala-Lys-NH₂

10

にはプロテインキナーゼC (Sigma、P7956、1.3 μ g/mL)、

Cys- β Ala-Arg-Arg-

Lys-Asp-Leu-His-Asp-Asp-Glu-Glu-Asp-Glu-Ala-Met-Ser-Ile-Thr-Ala-NH₂

および

Cys- β Ala-Arg-

Arg-Lys-Asp-Leu-His-Asp-Asp-Glu-Glu-Asp-Glu-Ala-Met-Ala-Ile-Ala-Ala-NH₂)

にはカゼインキナーゼ1 (New England Biolabs、P6030S、2.5 μ g/mL)、ならびに100 μ M / 20
mL ATP、および100 μ Ci/mLの γ -³²P-ATP (Amersham、9.25mBq/250 μ Ci/25 μ L、活性>5000
Ci/mmol) の混合物を含むキナーゼ緩衝液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM $MgCl_2$ 、4m
M DTT、2mM EGTA (pH7.5)) の1 μ Lを、ペプチド修飾ガラス表面にスポットし、室温のほ
ぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への
非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下
のように洗浄した。

洗浄緩衝液 (1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液 (pH7.5)、200mM NaCl) を
使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

30

80% ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【 0 1 3 4 】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量を
Phosphor Imagerシステム (FLA-3000、FUJIFILM) を使用して決定した (図1を参照のこと
) 。

40

【 0 1 3 5 】

実施例30：修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析 (図2を参照のこと
)

ペプチド

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂

および

Cys- β Ala-Leu-Arg-Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-NH₂

で修飾した表面 (マレイニミド官能基化ガラス表面、実施例1を参照のこと；マレイニミ

50

ドブチリル-β-アラニン官能基化セルロースおよびマレイニミドブチリル-β-アラニン官能基化ポリピロピレンメンブレン)を、10mLの100 μM ATPを含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5))と室温で10分間インキュベートした。次いで、表面を、プロテインキナーゼA (Sigma、P26452、U/mL)、100 μM/mL ATP、および100 μCi/mLのγ-³²P-ATP (Amersham、9.25mBq/250 μCi/25 μL、活性>5000Ci/mmol)の混合物を含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5))にて室温のほぼ水飽和環境下で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

洗浄緩衝液(1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液(pH7.5)、200mM NaCl)を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0136】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphor Imagerシステム(FLA-3000、FUJIFILM)を使用して決定した(図2を参照のこと)。

【0137】

実施例31：種々の修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析(図3を参照のこと)

ペプチドCys-βAla-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-NH₂で修飾した表面(マレイニミド官能基化ガラス表面、実施例1を参照のこと；およびマレイニミドブチリル-β-アラニン官能基化セルロース)を、10mLの100 μM ATPを含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150 mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5))と室温で10分間インキュベートした。次いで、表面を、プロテインキナーゼA (Sigma、P26452、U/mL)、100 μM/mL ATP、および100 μCi/mLのγ-³²P-ATP (Amersham、9.25mBq/250 μCi/25 μL、活性>5000Ci/mmol)の混合物を含むキナーゼ緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、30mM MgCl₂、4mM DTT、2mM EGTA (pH7.5))1 μLと混合し、室温のほぼ水飽和環境下で規定時間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

洗浄緩衝液(1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液(pH7.5)、200mM NaCl)を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0138】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphor Imagerシステム(FLA-3000、FUJIFILM)を使用して決定した(図3を参照のこと)。

【0139】

実施例32：種々の修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析（図8を参照のこと）

それぞれN末端をジペプチドシステイン-β-アラニンで修飾した正確に43個のセリン-および/またはトレオニン含有ペプチド（キナーゼの潜在的な基質ペプチド）および対応する対照ペプチドを、マイケル付加によってマレイニミド官能化ガラス表面に結合させた（実施例18を参照のこと）。ペプチドのアセンブリを、図8Aに示す。スポットのナンバリングを図8Cに認めることができ、使用したペプチド配列を、実施例18から得た。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10 mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼC（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25 で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

洗浄緩衝液（1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液（pH7.5）、200mM NaCl）を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1% SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0140】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphorImagerシステム（FLA-3000、FUJIFILM）を使用して決定した。得られた画像を図8Bに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼCによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図8Dに示す。プロテインキナーゼC基質として公知のペプチド（基質ペプチド番号3、23、27、41、43）およびプロテインキナーゼC基質として記載されていない他のペプチドが認識され、修飾ガラス表面上でこのキナーゼによってリン酸化されることが明らかである。したがって、このようなアセンブリはキナーゼ（例えば、プロテインキナーゼCなど）の基質特異性の特徴付けに適切であることが明らかである。

【0141】

実施例33：種々の修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析（図9を参照のこと）

それぞれN末端をジペプチドシステイン-β-アラニンで修飾した正確に43個のセリン-および/またはトレオニン含有ペプチド（キナーゼの潜在的な基質ペプチド）および対応する対照ペプチドを、マイケル付加によってマレイニミド官能化ガラス表面に結合させた（実施例18を参照のこと）。ペプチドのアセンブリを、図8Aに示す。スポットのナンバリングを図8Cに認めることができ、使用したペプチド配列を、実施例18から得た。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）を含む10 mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次いで、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼA（10U/mL）を、ATP/γ³²P-ATP混合物（100 μM/mL、100 μCi/mL）と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25 で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

洗浄緩衝液（1% SDSおよび1% Tween20を含む50mM TRIS緩衝液（pH7.5）、200mM NaCl）を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1%SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【 0 1 4 2 】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量を PhosphorImagerシステム (FLA-3000、FUJIFILM) を使用して決定した。得られた画像を図 9Bに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼAによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図9Dに示す。1つの例外を含むが、修飾ガラス表面上の全ペプチドが-2位および-3位 (N末端) の2つのアルギニン残基をセリンに運ぶプロテインキナーゼAによって認識およびリン酸化されることが明らかである。この配列モチーフRRXSを、プロテインキナーゼAの好ましい基質モチーフとして記載する (A. Kreegipuu, N. Blom, S. Brunak, J. Jarv, 1998, 「Statistical analysis of protein kinase specificity determinants」、FEB S Lett., 430, 45~50)。基質モチーフの過剰なN末端の局在化によりペプチド83はおそらくリン酸化されない。したがって、このようなアセンブリはキナーゼ (例えば、プロテインキナーゼAなど) の基質特異性の特徴付けに適切であることが明らかである。

10

20

【 0 1 4 3 】

実施例34：種々の修飾ガラス表面上へのキナーゼ媒介ペプチド修飾の分析 (図10を参照のこと)

それぞれN末端をジペプチドアミノオキシ酢酸-β-アラニンで修飾した正確に79個のペプチドを、アルデヒド官能化ガラス表面に結合させた (実施例20を参照のこと)。MBPの一次構造を図10Cに示す。太字で示した残基について、プロテインキナーゼAによるリン酸化は先行技術に記載されている (A. Kishimoto, K. Nishiyama, H. Nakanishi, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama, Y. Nishizuka, 1985, 「Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase」、J. Biol. Chem., 260, 12492~12499)。スキャン中の13量体ペプチドは、2つのアミノ酸配列のシフトを示す。ペプチドアセンブリを図10Bに示す。したがって、ペプチド番号1はMBPの一次構造の1~13のアミノ酸配列を示し、ペプチド番号2はMBPの一次構造の3~15アミノ酸配列を示す。ガラス表面に3つの同一のサブアレイをのせた。これらのサブアレイの1つを図10Aに示す。ペプチドをのせた後、修飾ガラス表面を、第1に、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) を含む10mLの100 μMのATP溶液を使用して10分間予備インキュベートした。次に、修飾ガラス表面をカバーガラスで覆い、プロテインキナーゼA (10U/mL) を、ATP/γ³²P-ATP混合物 (100 μM/mL、100 μCi/mL) と共に毛管力によって形成された中間区間に挿入した。25 で30分間インキュベートした。ATPまたはキナーゼ分子のガラス表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを減少させるために、修飾ガラス表面を、以下のように洗浄した。

30

40

洗浄緩衝液 (1%SDSおよび1%Tween20を含む50mM TRIS緩衝液 (pH7.5)、200mM NaCl) を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

1M NaCl溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

80%ギ酸のエタノール溶液を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を2回行う。

6M尿素、2Mチオ尿素、および1%SDSを含む溶液を使用した50 で5分間の洗浄を2回行う。

。

蒸留水を使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

50

メタノールを使用した室温で3分間の洗浄を3回行う。

【0144】

ガラス表面の乾燥後、ガラス表面結合ペプチド中に組み込まれた放射性リン酸塩の量をPhosphorImagerシステム（FLA-3000、FUJIFILM）を使用して決定した。得られた画像を図10Aに示す。3つ全てのサブアレイ中でより高いシグナル強度を有するスポットを、プロテインキナーゼAによってリン酸化された対応するペプチドに割り当てた。これらの一次構造を図10Dに示す。修飾ガラス表面上のほとんどのペプチドが溶液中で行われた実験でも見出されたプロテインキナーゼAによって認識およびリン酸化されることが明らかである（A. Kishimoto, K. Nishiyama, H. Nakanishi, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama, Y. Nishizuka, 1985, 「Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase」、J. Biol. Chem., 260, 12492 ~ 12499）。

10

【0145】

前記説明、実施例、特許請求の範囲、図面、および配列プロトコールで開示の本発明の特徴は、個別および任意の組み合わせのいずれでもその種々の態様で本発明の実施に重要であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0146】

【図1】異なる修飾ガラス表面の異なるキナーゼとのインキュベーションの結果を示す図である。

20

【図2】種々の修飾表面とプロテインキナーゼAとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図3】種々の修飾表面のプロテインキナーゼAとの時間依存的インキュベーションの結果を示す図である。

【図4】異なる修飾ガラス表面の異なる濃度のプロテインキナーゼAとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図5】修飾ガラス表面のプロテインキナーゼAとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図6】修飾ガラス表面（11760スポット）のキナーゼとのインキュベーションの結果を示す図である。

30

【図7】修飾ガラス表面（960スポット）のキナーゼとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図8】一組の潜在的な基質ペプチドおよび対応する対照ペプチドで修飾したガラス表面のプロテインキナーゼCとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図9】一組の潜在的な基質ペプチドおよび対応する対照ペプチドで修飾したガラス表面のプロテインキナーゼAとのインキュベーションの結果を示す図である。

【図10】一組の潜在的な基質ペプチドで修飾したガラス表面のプロテインキナーゼAとのインキュベーションの結果を示す図である。

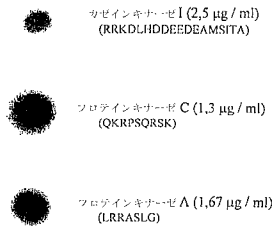
【図11】種々の化学的選択反応の概要を示す図である。

【図12】支持体表面に方向性をもって固定された化合物アセンブリの種々の態様の概略構造を示す図である。

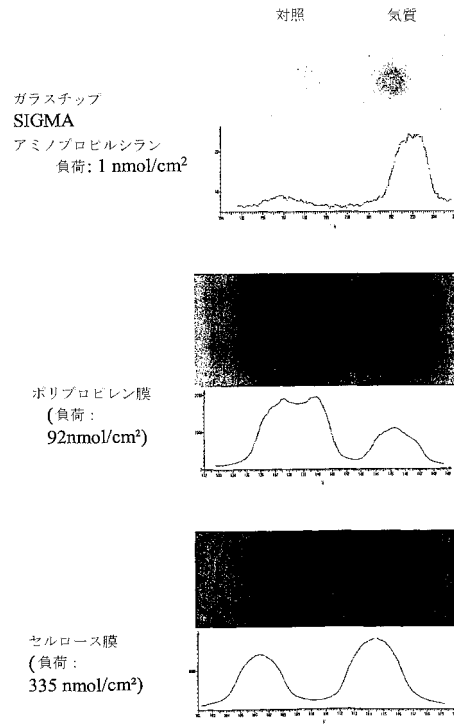
40

【図 1】

対照 基質



【図 2】

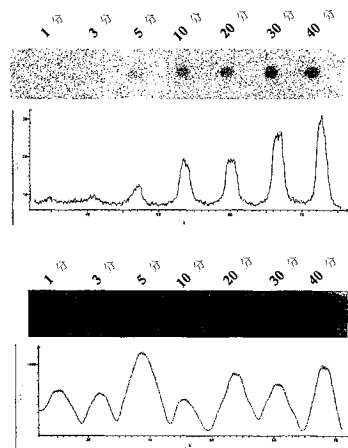


【図 3】

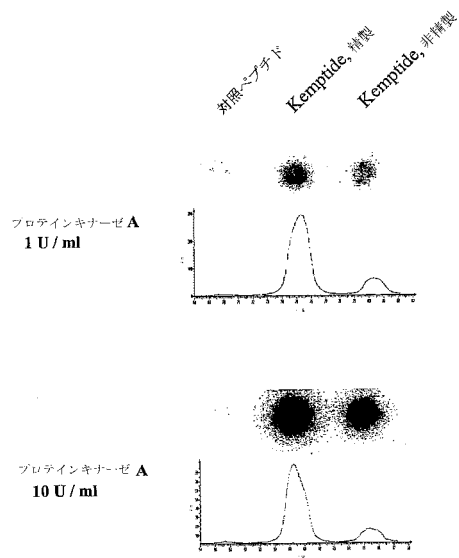
反応時間:

ガラス表面
Sigma
マレイニミド修飾

反応時間:

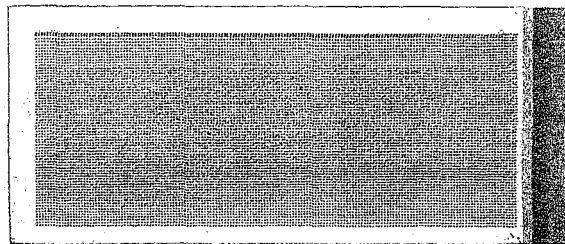
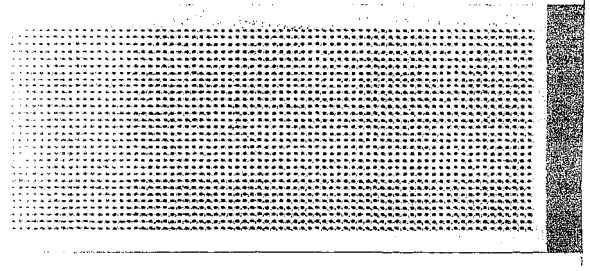
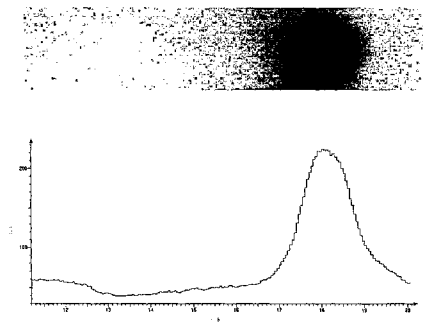
ポリプロピレン膜
マレイニミド修飾

【図 4】



【圖 7】

Kemptide



【 図 9 】

[illegible]

A

Figure 1 consists of three 10x10 grids labeled (a), (b), and (c). Each grid contains black and white squares. In grid (a), the black squares are concentrated in the center, forming a roughly circular shape. In grid (b), the black squares are more spread out, and the white squares are more numerous. In grid (c), the black squares are mostly in the center, and the white squares are mostly on the edges, forming a border around the black squares.

AKKRIJSSURA
GRTGRANSI
DODELSITRR
ERSPSPFR
GRPTSPFADG
KKKWLRSLSVAA
KKLNTLSVA
KKRSLTSPRSYR
PLSRTLSVANK
PLSRTLSVSS
QKRSPRSKYL
RPPATF
KKRFSKKSKFL
PPKPSORRR
RPAKSLQKNV
REMSRST

72	71	70	69	68	67	66	65	64	63	62	61	60	59	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

C

CBKRRRLSSLRK
CRGNTGRNSI
CBGRPTSSPAEG
CDKRREILSRPSYR
CBQKPSQSRSKYL
CBRFARAGSLRQKNV
CDLRRASLG

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)		C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/527 (2006.01)		C 1 2 Q 1/527	
C 1 2 Q 1/533 (2006.01)		C 1 2 Q 1/533	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シュナイダー - マーガナー イェンス
ドイツ国 ベルリン ホーヘンゾーリーネンデム 7

(72)発明者 シャコフスキ マイク
ドイツ国 ジールゲローダ アム グロッケンスツール 2 7

(72)発明者 ライマル ウォルフ
ドイツ国 ベルリン プレッツラワー アレ 2 0 8

(72)発明者 ドン リイン
ドイツ国 ベルリン ラムラーシュトラッセ 2 0

(72)発明者 パンセ ソーレン
ドイツ国 ベルリン ルーデリッツシュトラッセ 1 0

(72)発明者 シャルン ダーク
ドイツ国 ベルリン ベルリナー シュトラッセ 9 5

(72)発明者 オースターカンブ フランク
ドイツ国 ベルリン ニポウシュトラッセ 1 1

(72)発明者 フンメル ゲルト
ドイツ国 ベルリン パンクシュトラッセ 1 2

(72)発明者 ジョブロン ローレンス
ドイツ国 ベルリン パンクシュトラッセ 1 2

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Nature Genet., (2000), 26, [3], p.283-289
Anal. Biochem., (1999), 276, [2], p.227-241
Science, (2000), 289, [5485], p.1760-1763
Curr. Opin. Biotechnol., (2001.02), 12, [1], p.59-64
加藤郁之進監訳, 「DNAマイクロアレイ」, 初版, 宝酒造株式会社, (2000), p.1-17

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00-1/70

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)