

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5129936号
(P5129936)

(45) 発行日 平成25年1月30日(2013.1.30)

(24) 登録日 平成24年11月9日(2012.11.9)

(51) Int. Cl. F 1
C07H 15/18 (2006.01) C O 7 H 15/18
C07K 1/22 (2006.01) C O 7 K 1/22
C07K 14/47 (2006.01) C O 7 K 14/47

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2006-198104 (P2006-198104)	(73) 特許権者	000173924 公益財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀 1-8-1
(22) 出願日	平成18年7月20日(2006.7.20)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(65) 公開番号	特開2007-269768 (P2007-269768A)	(72) 発明者	佐藤 玲子 東京都品川区小山台 1-30-15-20 1
(43) 公開日	平成19年10月18日(2007.10.18)	(72) 発明者	戸潤 一孔 神奈川県相模原市陽光台 4-8-36
審査請求日	平成21年5月28日(2009.5.28)	審査官	三上 晶子
(31) 優先権主張番号	特願2006-61921 (P2006-61921)		
(32) 優先日	平成18年3月7日(2006.3.7)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

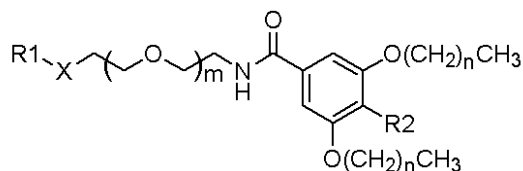
(54) 【発明の名称】 糖鎖結合物質の精製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

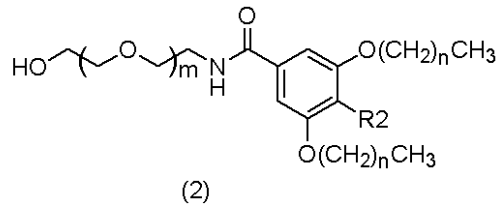
式(1)で示される糖鎖を部分構造とする両親媒性物質、または、式(1)で示される化合物と式(2)で示される化合物の混合物が形成するミセル水溶液を用い、このミセル水溶液を疎水表面と接触させることによって、当該両親媒性物質、または、それを含む混合物を、当該疎水表面に固定化する方法。

【化 1】



(ただし、式中で、mは1から100までの整数を、nは11から17までの整数を、XはOまたはNHを、R1は単糖またはオリゴ糖または還元末端が開環したオリゴ糖を、R2はO(CH₂)_nCH₃またはHを表す。)

【化2】



(ただし、式中で、 m は1から100までの整数を、 n は11から17までの整数を、 R_2 は $O(CH_2)_nCH_3$ または H を表す。)

【請求項2】

請求項1に記載した方法で固定化された糖鎖を用いることを特徴とする糖鎖に結合する物質の精製法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な糖鎖を部分構造とする両親媒性物質の固定化の方法、及び、その方法によって固定化された糖鎖を用いて糖鎖に結合する物質を精製する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

糖鎖は生体内で様々な機能を担っていることが知られている(例えば、非特許文献1参照)。そうした糖鎖の機能の多くは、各々の糖鎖とそれを特異的に認識する物質との相互作用を分子的な基盤としている。従って、糖鎖に結合する物質を精製する方法は、糖鎖の機能を医薬品や診断薬に応用する上で重要である。

【0003】

我々はこれまでに、長鎖アルキルオキシベンジルアルコール誘導体あるいは長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を基本骨格とする人工脂質に糖鎖を結合した糖鎖プローブ(特許文献1~3参照)、あるいは、長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体の基本骨格に天然由来の糖鎖を還元アミノ化によって導入した糖鎖プローブ(特許文献4参照)等を提供してきた。これらの人工脂質型の糖鎖プローブは、その脂質部分を利用してプラスチックディッシュ等の疎水表面に固定することにより、糖鎖に結合する物質を探索、捕捉するための糖鎖プローブとして使用することができる。しかし、疎水表面上に固定した糖脂質型の糖鎖プローブには、表面自体の疎水性あるいは人工脂質部分に由来すると考えられる非特異的な相互作用が問題になる場合があった。

【0004】

そこで、我々は、そうした疎水性相互作用に由来する非特異的な相互作用をできる限り低く抑える目的で、オリゴエチレングリコールが結合した長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を提供し、そうした化合物を疎水表面に固定することで、非特異的な相互作用が低減できることを示している(特許文献5参照)。さらに、その末端に糖鎖を導入した糖鎖プローブを提供している(特願2005-159038参照)。

【0005】

一般に、両親媒性の糖脂質型の糖鎖プローブ化合物を疎水表面に固定化するには、その有機溶媒溶液を用いるか、それを有効成分とするリポソームを用いるのが一般的であり、我々が提供する各種の糖鎖プローブの固定化にも同様の手法を用いてきた。

【0006】

しかし、通常的手段として用いられるプラスチックディッシュ等への固定化を考えた場合、有機溶媒の溶液を用いる手法では、エタノールのような一部の溶媒を除き、プラスチックディッシュを溶解するために、適用は不可能であるし、エタノール溶液を用いても、単純にエタノールを蒸発される通常の方法では均一な糖鎖の提示は困難である(例えば、非特許文献2参照)。また、一般に、糖鎖を部分構造とする両親媒性物質単体では、リポソ

10

20

30

40

50

ームを形成するものはほとんどなく、リポソームを形成する化合物との混合が必要となる、あるいは、リポソームの作成及びその固定化には、多段階の手順と熟練を要する（例えば、非特許文献3参照）といった難点があった。

【特許文献1】特開2001-122889

【特許文献2】特開2001-253896

【特許文献3】特開2002-30091

【特許文献4】特開2004-75641

【特許文献5】特開2005-232061

【非特許文献1】谷口直之他編、「糖鎖機能」（蛋白質核酸酵素2003年6月号増刊、共立出版、2003年）

【非特許文献2】ラングミュア(Langmuir)、2004年、20巻、p.9720-9728

【非特許文献3】ビオキミカ・ビオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、1992年、1103巻、307-316

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、新規な糖鎖を部分構造とする両親媒性物質の固定化の方法、および、その方法によって固定化された糖鎖を用いる糖鎖に結合する物質の精製法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

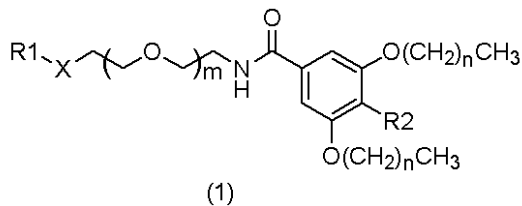
上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、オリゴエチレングリコール誘導体を介して糖鎖と長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を結合した化合物が水中でミセルを形成することを発見したことを端緒に、新たに、糖鎖を部分構造とする両親媒性物質またはその混合物が形成するミセル水溶液を用いて、その化合物またはその混合物が疎水表面上に固定化可能であること、固定化された糖鎖提示化合物が糖鎖に結合する物質を選択的に捕捉し、捕捉された糖鎖に結合する物質は回収可能であることを見出して、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、糖鎖を部分構造とする両親媒性物質、または、それを含む混合物が形成するミセル水溶液を用い、このミセル水溶液を疎水表面と接触させることによって、当該両親媒性物質、または、それを含む混合物を、当該疎水表面に固定化する方法を提供する。

また、本発明は、式(1)で示される糖鎖を部分構造とする両親媒性物質、または、式(1)で示される化合物と式(2)で示される化合物の混合物が形成するミセル水溶液を用い、このミセル水溶液を疎水表面と接触させることによって、当該両親媒性物質、または、それを含む混合物を、当該疎水表面に固定化する方法を提供する。

【化3】



(ただし、式中で、mは1から100までの整数を、nは11から17までの整数を、XはOまたはNHを、R1は単糖またはオリゴ糖または還元末端が開環したオリゴ糖を、R2はO(CH₂)_nCH₃またはHを表す。)

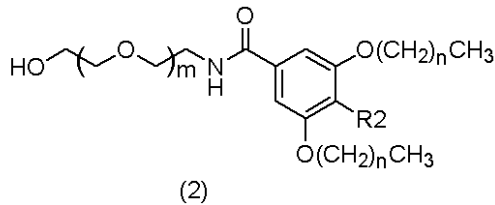
10

20

30

40

【化 4】



(ただし、式中で、 m は1から100までの整数を、 n は11から17までの整数を、 R_2 は $O(CH_2)_nCH_3$ または H を表す。)

さらに、本発明は、上記の方法で固定化された糖鎖を用いることを特徴とする糖鎖に結合する物質の精製法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、新規な糖鎖を部分構造とする両親媒性物質の固定化の方法、及び、その方法によって固定化された糖鎖を用いる糖鎖に結合する物質の精製法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の固定化方法及び精製方法には、式(1)で示される化合物以外に、一般に、糖鎖を部分構造とする両親媒性物質、あるいは、式(2)で示される化合物以外に、一般に、ミセルを形成する両親媒性物質を用いることが可能である。糖鎖を部分構造とする両親媒性物質としては、天然由来のスフィンゴ糖脂質やグリセロ糖脂質、有機合成によるスフィンゴ糖脂質及びグリセロ糖脂質の誘導体及び類縁体等を代表例として、糖鎖と直鎖アルキル鎖を直接、あるいは、介在構造を介して結合させたネオグリコリピッドと総称される化合物が挙げられる。ミセルを形成する両親媒性物質としては、天然由来のスフィンゴリン脂質やグリセロリン脂質、有機合成によるスフィンゴリン脂質及びグリセロリン脂質の誘導体及び類縁体等を代表例として、一般に、親水基と直鎖アルキル鎖を直接、あるいは、介在構造を介して結合させた化合物が挙げられる。本発明の目的から、直鎖アルキル鎖を2本以上有する化合物が望ましい。

【0012】

以下では、便宜上、式(1)及び式(2)で示される化合物を例として説明を行う。

式(1)及び式(2)で示される化合物は、既知の合成法(特開2005-232061、特許願2005-159038参照)に従って合成される。

式(1)において、 m は1から100までの整数が有効であるが、十分に低い非特異相互作用を与えること、化合物調製に必要とする工程数等を考慮すると、好ましくは2から11の整数である。また、式(1)の R_1 として、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、キシロース、 N -アセチルグルコサミン、 N -アセチルガラクトサミン、シアル酸、グルクロン酸、イズロン酸等の単糖、天然の糖蛋白質由来の N -結合型糖鎖または O -結合型糖鎖、または、それらの部分オリゴ糖、天然の糖脂質由来の糖鎖、または、その部分オリゴ糖、天然のプロテオグリカン由来の糖鎖、または、その部分オリゴ糖、あるいは、有機合成等を用いて調製した天然型および非天然型の糖鎖等が挙げられる。

【0013】

式(1)で示される化合物の内、 X が O である化合物は、通常用いられるグリコシレーションを用いる糖鎖導入法(例えば、木曾眞編、「生理活性糖鎖研究法」(学会出版センター、東京、1999年)参照)によって合成される。また、 X が NH である化合物は、還元アミノ化法(例えば、特開2004-75641参照)を用いることによって、還元末端の糖残基が開環した形で糖鎖が導入される。糖鎖部分の保護、脱保護が不要なため、天然由来の糖鎖導入にはこの還元アミノ化を用いる方法が有効である。

糖鎖の導入手順は、式(1)において R_1 が H である合成中間体を経て、最後に糖鎖導入を行う上記の方法以外に、一端または両端がアミノ基に変換されたエチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの一端のアミノ基を適当な保護基で保護した化合物、あるい

10

20

30

40

50

は、保護されたアミノ基の代わりに容易にアミノ基に変換可能な官能基（例えば、アジド等）とした化合物に対して、まず、上記と同様に糖鎖導入を行い、次いで、アミノ基の脱保護、あるいは、アミノ基への変換を行い、その後、長鎖のアルキル基がエーテル結合した3,5-ジヒドロキシ安息香酸あるいは3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸との縮合を行う手順を用いることもできる。

式(2)で示される化合物は、式(1)で示される化合物との混合物がミセル水溶液を与えれば、それぞれのm、n及びR2を独立に選択することが可能であるが、式(1)で示される化合物と同一のm、n、R2を選択することが望ましい。

【0014】

式(1)で示される化合物、あるいは、式(1)で示される化合物と式(2)で示される化合物との混合物を固定化するには、例えば、以下の手順によって行う。まず、式(1)で示される化合物、あるいは、式(1)で示される化合物と式(2)で示される化合物との混合物を水に懸濁させ、1nMから1M、好ましくは0.1mMから100mMのミセル溶液とし、プラスチックディッシュ、マイクロビーズ、中空糸等の適当な形状を持った疎水性表面に接触させることにより、当該化合物またはその混合物を、それらの疎水性表面上に固定化する。

【0015】

このようにして固定化された糖鎖を用いて、その糖鎖と結合する物質を精製するには、例えば、以下の手順によって行う。まず、目的とする糖鎖に結合する物質を含む溶液を、化合物が固定された表面と接触させることにより、糖鎖に結合する物質を捕捉し、次いで、糖鎖と結合しない物質を洗い流す。こうして捕捉された糖鎖に結合する物質を、例えば、より強い洗いの条件を用いる、あるいは、pHや温度を変化させる、あるいは、酸化や還元や光反応等を用いる、あるいは、蛋白質や糖鎖の消化酵素を用いる等の、適当な手段によって回収することによって、特定の糖鎖構造と選択的に結合する物質を精製することができる。

以下に、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の記述に限定されるものではない。

【実施例1】

【0016】

(ミセル水溶液を用いた固定化と糖鎖結合物質との相互作用解析)

ミセル水溶液を用いて、糖鎖プローブを疎水性表面に固定化し、ウシ血清アルブミン(BSA)及び、糖鎖を認識する蛋白質であるレクチンとの相互作用を、分子間相互作用解析装置IAsysPlus(Affinity Sensors社製)を用いて解析した。

【0017】

N-(O-(D-マンノピラノシル)-17-オキシ-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデシル)-3,5-ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミド(式(1)において、R1がマンノース、XがO、mが5、nが11、R2がHである化合物)が2mMになるように純水に懸濁させ、100nmの孔径を持つポリカーボネート製フィルターを通すことによりミセル水溶液を作成した。

IAsysPlusの疎水キュベットを、界面活性剤水溶液、バッファーで洗浄後、上記ミセル水溶液を60µL加え1分間放置し、その後、排出。この一連の操作を3回繰り返して化合物の固定化を行った。

化合物が固定化されたキュベットを塩酸水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、バッファーで洗浄した。BSAの1mg/mL溶液を50µL添加して5分間放置、さらに、バッファーに置換して3分間放置した後のBSAの結合量を求めた。

また、マンノースに特異的に結合するレクチンであるコンカナバリンA(ConA)の20µM溶液を50µL添加して5分間放置、さらに、バッファーに置換して3分後のConAの結合量を求めた。

【0018】

N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミドの固定化量は 549.49 Arcsec.、BSAの結合量は 8.86 Arcsec.、ConAの結合量は 1905.91 Arcsec. であり、疎水性に由来する BSA との非特異的な相互作用はほとんど観察されないが、糖鎖に結合する物質である ConA は糖鎖構造特異的に捕捉されることが確認された。捕捉された ConA は、100 mM リン酸水溶液を用いることにより回収された。

【実施例 2】

【0019】

(混合物のミセル水溶液を用いた固定化と糖鎖結合物質との相互作用解析)

10

N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミド、及び、N - (17 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミド (式 (2) において、m が 5、n が 11、R2 が H である化合物) の混合物を用いて、混合物の濃度が 2 mM であるミセル溶液を調製し、実施例 1 と同様の解析を行った。

【0020】

N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミドが 50% の場合、混合物の固定化量は 444.42 Arcsec.、ConA の結合量は 1126.38 Arcsec. であった。同じく、30% の場合、混合物の固定化量は 526.35 Arcsec.、ConA の結合量は 1065.62 Arcsec. であった。同じく、20% の場合、混合物の固定化量は 551.38 Arcsec.、ConA の結合量は 1079.41 Arcsec. であった。同じく、10% の場合、混合物の固定化量は 692.21 Arcsec.、ConA の結合量は 963.59 Arcsec. であった。同じく、5% の場合、混合物の固定化量は 553.47 Arcsec.、ConA の結合量は 325.12 Arcsec. であった。同じく、3% の場合、混合物の固定化量は 556.56 Arcsec.、ConA の結合量は 325.12 Arcsec. であった。同じく、2% の場合、混合物の固定化量は 583.13 Arcsec.、ConA の結合量は 213.83 Arcsec. であった。

20

30

また、いずれの場合にも、BSA の結合量は低い値を示し、混合物のミセル水溶液を用いても糖鎖に結合する物質が糖鎖構造特異的に捕捉されることが確認された。捕捉された ConA は、100 mM リン酸水溶液を用いることにより回収された。

【実施例 3】

【0021】

(プラスチックディッシュへの固定化と構造特異的な糖鎖結合物質の結合)

ミセル水溶液を用いる糖鎖プローブのプラスチックディッシュへの固定化と、その結果得られた糖鎖が固定化されたプラスチックディッシュを用いる構造特異的な糖鎖結合物質の捕捉を検討した。

N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミド (式 (1) において、R1 が - マンノース、X が O、m が 5、n が 11、R2 が H である化合物)、及び、N - (O - (- D - ガラクトピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミド (式 (1) において、R1 が - ガラクトース、X が O、m が 5、n が 11、R2 が H である化合物)、及び、N - (17 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミド (式 (2) において、m が 5、n が 11、R2 が H である化合物)、それぞれの 1 mM ミセル水溶液を調製し、100 nm の孔径を持つポリカーボネート製フィルターを通した。

40

96穴プラスチックディッシュ (ナルジェヌク、ヌンクロナデルタ処理) の各ウエル

50

に、上記のミセル溶液 100 μ l を添加し、室温で一晩放置した。ミセル溶液を吸引によって除き、200 μ l の HEPES バッファーで洗浄することによって糖鎖が固定化されたプラスチックディッシュを得た。

【0022】

このプラスチックディッシュの各ウエルに適当に希釈したペルオキシダーゼ標識された ConA 溶液（生化学工業）100 μ l を加え2時間放置の後、ConA 溶液を吸引によって除き、200 μ l の HEPES バッファーで3回洗浄した。

次いで、TMB キット HYPER（ナカライ）を用いてペルオキシダーゼ発色反応を行った。100 μ l の発色液を加え10分間放置の後、100 μ l の反応停止液を加え、マイクロプレートリーダーにより各ウエルの発色を450 nm の吸光度として測定した。

マンノース誘導体を固定化したウエルの吸光度は 1.288 ± 0.116 、ガラクトース誘導体を固定化したウエルの吸光度は 0.107 ± 0.002 、糖鎖を結合していない化合物を固定化したウエルの吸光度は 0.084 ± 0.010 であり、プラスチックディッシュへの固定化と糖鎖構造特異的な糖鎖結合物質の結合が確認された。

【実施例4】

【0023】

（プラスチックディッシュへのマンノース混合物ミセル溶液を用いた固定化）

N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミド(式(1)において、R1が - マンノース、XがO、mが5、nが11、R2がHである化合物)と N - (17 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミド(式(2)において、mが5、nが11、R2がHである化合物)の混合物のミセル溶液を用いて、実施例3と同様の条件によって、プラスチックディッシュへの固定化とConAの選択的結合の測定を行った。

マイクロプレートリーダーによる吸光度測定の結果、マンノース100%では 0.605 ± 0.015 、マンノース50%では 0.361 ± 0.013 、マンノース10%では 0.172 ± 0.005 、マンノース1%では 0.091 ± 0.004 、マンノース0%では 0.083 ± 0.002 であり、混合物の固定化とマンノース含有率に依存した糖鎖結合物質の結合を確認した。

【実施例5】

【0024】

（プラスチックディッシュへのガラクトース混合物ミセル溶液を用いた固定化）

N - (O - (- D - ガラクトピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミド(式(1)において、R1が - ガラクトース、XがO、mが5、nが11、R2がHである化合物)と N - (17 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミド(式(2)において、mが5、nが11、R2がHである化合物)の混合物のミセル溶液を用いて、実施例3と同様の条件によって、プラスチックディッシュへの固定化を行い、ペルオキシダーゼ標識されたRCA120溶液（生化学工業）を用いて糖鎖構造選択的結合の測定を行った。

マイクロプレートリーダーによる吸光度測定の結果、ガラクトース100%では 0.571 ± 0.033 、ガラクトース50%では 0.374 ± 0.062 、ガラクトース10%では 0.286 ± 0.039 、ガラクトース1%では 0.097 ± 0.001 、ガラクトース0%では 0.077 ± 0.006 であり、混合物の固定化とガラクトース含有率に依存した糖鎖結合物質の結合を確認した。

【産業上の利用可能性】

【0025】

本発明は、新規な糖鎖を部分構造とする両親媒性物質の簡便かつ均質な固定化方法を提供するものであり、特に、生体由来試料等やファージ抗体ライブラリー等の非特異結合のバックグラウンドが高い試料から、糖鎖に結合する物質を選択的に精製するのに有効に利

10

20

30

40

50

用できる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2004-075641(JP,A)
特開2001-253896(JP,A)
特開2005-232061(JP,A)
特開2006-335652(JP,A)
佐藤玲子 他, 平面上の糖鎖認識におけるレクチン立体構造の影響, 日本化学会講演予稿集, 2004年, Vol.84th, No.2, p.1334
Methods in Enzymology, 1989年, Vol.179, pp.542-558
Langmuir, 2000年, Vol.16, pp.8842-8849

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00 - 99/00
C07K 1/00 - 19/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)