

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-241389
(P2005-241389A)

(43) 公開日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	
GO 1 N 33/533	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 33/545	GO 1 N 33/545	A
GO 1 N 33/553	GO 1 N 33/553	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-50592 (P2004-50592)	(71) 出願人 597035894 お茶の水女子大学長 東京都文京区大塚二丁目1番1号
(22) 出願日 平成16年2月25日 (2004.2.25)	(74) 代理人 100102314 弁理士 須藤 阿佐子
特許法第30条第1項適用申請有り 平成15年8月25日発行の「生化学 第75巻第8号 第76回日本生化学会大会発表抄録集」に発表	(74) 代理人 100123984 弁理士 須藤 晃伸
	(72) 発明者 小川 温子 東京都文京区大塚二丁目1番1号 お茶の水女子大学内
	Fターム(参考) 2G054 AA10 AB10 CA25 CB02 CB03 CE02 EA03 GA04 GB02

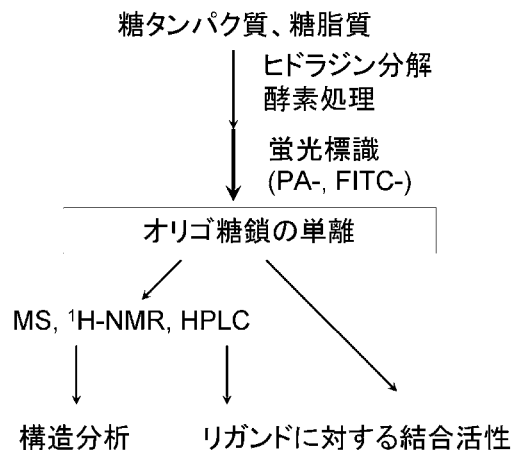
(54) 【発明の名称】 蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬および固定化方法

(57) 【要約】

【課題】 糖鎖リガンドとの相互作用解析を目指した蛍光標識糖鎖の固定化技術の開発

【解決手段】 蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製し、これらの抗体試薬を用いて蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化することを特徴とする蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。抗体試薬が、糖タンパク質または糖脂質糖鎖のコア構造の2～7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。抗体試薬が、上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製し、これらの抗体試薬を用いて蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化することを特徴とする蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

【請求項2】

抗体試薬が、糖タンパク質または糖脂質糖鎖のコア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項1の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法

10

【請求項3】

抗体試薬が、上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる請求項2の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

【請求項4】

マイクロタイタ-プレート、高分子膜、クロマトグラフィー用支持体またはセンサーチップの金表面である固相表面に固定化する請求項1, 2または3の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

20

【請求項5】

糖タンパク質または糖脂質糖鎖コア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体よりなる蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬。

【請求項6】

上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる請求項5の蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖鎖リガンドとの相互作用解析を目指した蛍光標識糖鎖の固定化に関する。より詳細には本発明は、蛍光標識したオリゴ糖鎖を蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化するための特異的固定化試薬、およびそれを用いた固定化方法の開発に関する。

【背景技術】

【0002】

糖が持つ生理機能の発現には、多くの場合、糖リガンドが糖レセプターと相互作用をすることが必須であり、糖レセプターの探求と機能解析が、糖鎖の機能発現の機序の解明、ひいては糖レセプターを刺激または不活化する薬物の創生のための重要なステップであり、また、レセプター側からみれば、実際に生体内で機能している真のリガンドの探索、そして、より強力なリガンドのスクリーニングが最も有効な研究戦略であると認識されている。上記のような糖機能の探求活動に欠かすことができないのが、糖と糖レセプター等の標的物との相互作用を測定し、相互作用を定量的に解析することである。ここで「相互作用」とは、分子間に働く、静電力、共有結合、疎水結合、ファンデルワールス力および水素結合のうち、少なくとも1つから生じる分子間力に働く力による作用を意味する。具体的な例としては、情報伝達物質のリガンドとレセプターとの間の結合と解離、接着分子と

40

50

その相手方分子との結合と解離、抗原と抗体との間の結合と解離、酵素と基質との間の結合と解離および酵素と基質との結合と解離の結果生じた基質の分解反応、基質間の転移反応などが挙げられる。また、糖と糖結合タンパク質であるレクチンとの結合と解離、糖と細胞または細胞の断片との結合と解離、糖と高分子との結合と解離、デンプンのアルファ-化等のような非共有結合に起因する構造の変化などが挙げられる。

【0003】

生体内に存在する複合糖質の糖鎖は非常に不均一性が高く、糖鎖の微細構造の差も含めた完全な分離・精製は従来たいへん困難であった。1980年代に我が国で開発された2-アミノピリジル化(PA化)をはじめとする糖鎖の蛍光標識化技術の開発により、糖鎖の微量検出・分離は非常に容易になった。すなわち図1に示すように、簡単な標識化操作とHPLCによる分離によって、サブピコモルレベルの極微量しか含まれない糖鎖でも、構造的に均一な精製糖鎖標品として得ることができるようになった。得られた精製蛍光標識化糖鎖は、酵素消化とHPLCを組み合わせた溶出位置の変化を糖鎖マップデータと比較しつつ構造推定する3次元糖鎖マップ分析、ならびにNMR測定によって完全な構造を決定することができ、こうして近年は天然に存在する複合糖質の糖鎖構造データが豊富に蓄積するようになった。

10

現在では質量分析方法の発展によって複合糖質からきりだした糖鎖を未標識の混合状態のまま質量測定し、既報のデータと一致する構造をもつ糖鎖についてはマススペクトル上でのフラグメント化も含めた質量データから構造を推定できるようになった。しかし新規な構造の糖鎖についてはこの方法が適用できず、標識後の構造解析が必要であり、糖鎖の蛍光標識化とその精製は、糖鎖構造解析の目的で現在も使用されている。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

こうして得られた蛍光標識化糖鎖を固相表面に結合できれば、糖鎖認識物質との相互作用を定量的に解析することができる。

しかし、図2に示すように、従来の還元末端を介して活性基を導入した固相に固定化する方法は、還元末端が誘導化に使われている蛍光標識糖鎖には適用できない。また標識試薬をアミノ基に変換する化学的方法が報告されているが、煩雑な反応操作が必要で収率低下が問題となる。合成糖鎖からは、固相表面に結合しやすい人工糖脂質や糖タンパク質の形に変換する方法も用いられてきたが、生体成分から精製した糖鎖では、その前に蛍光標識基をはずす操作が必須である。

30

【0005】

本発明は、糖鎖リガンドとの相互作用解析を目指した蛍光標識糖鎖の固定化技術、より詳細には、糖タンパク質のN-型糖鎖のみならず、糖タンパク質のO-型糖鎖、糖脂質糖鎖、多糖類、遊離オリゴ糖鎖から誘導した、蛍光物質をはじめとする種々の低分子標識糖鎖の固定化に適用可能な蛍光標識糖鎖の固定化技術の開発を目的とする。

本発明は、蛍光標識したオリゴ糖鎖を蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化するための特異的固定化試薬、およびそれを用いた固定化方法の提供を目的とする。

本発明は、2-アミノピリジンおよびその誘導体を用いて蛍光標識したオリゴ糖鎖を蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのままマイクロタイタ-プレート、高分子膜、センサーチップの金表面など、固相表面に固定化するための特異的固定化試薬、それを用いた固定化方法を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

すなわち、本発明は、上記課題を解決するために、以下の(1)~(4)の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法を要旨とする。

(1) 蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製し、これらの抗体試薬を用いて蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化することを特徴とする蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

50

(2) 抗体試薬が、糖タンパク質または糖脂質糖鎖コア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記(1)の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

(3) 抗体試薬が、上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる上記(2)の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

(4) マイクロタイタ-プレート、高分子膜、クロマトグラフィー用支持体またはセンサーチップの金表面である固相表面に固定化する上記(1)、(2)または(3)の蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法。

【0007】

また、本発明は、以下の(5)~(6)の蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬を要旨とする。

(5) 糖タンパク質または糖脂質糖鎖のコア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体よりなる蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬。

(6) 上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる上記(5)の蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬。

【発明の効果】

【0008】

糖機能の探求活動に欠かすことができないのが、糖と糖レセプター等の標的物との相互作用の測定に相互作用を定量的に解析することであるところ、本発明は、糖鎖リガンドとの相互作用解析を目指した蛍光標識糖鎖の固定化の技術、より詳細には、糖タンパク質のN-型糖鎖のみならず、糖タンパク質のO-型糖鎖、糖脂質糖鎖、多糖類、遊離オリゴ糖鎖から誘導した、蛍光物質をはじめとする種々の低分子標識糖鎖の固定化に適用可能な蛍光標識糖鎖の固定化の技術を提供することができる。

また、本発明は、蛍光標識したオリゴ糖鎖を蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化するための特異的固定化試薬、およびそれを用いた固定化方法を提供することができる。

また、本発明は、2-アミノピリジンおよびその誘導体を用いて蛍光標識したオリゴ糖鎖に化学変化を加えずにそのままマイクロタイタ-プレート、高分子膜、クロマトグラフィー用支持体、センサーチップの金表面など、固相表面に固定化するための特異的固定化試薬、それを用いた固定化方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下に、本発明の好ましい実施の形態について、説明する。

本発明は、蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製し、これらの抗体試薬を用いて蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化することを特徴とする蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法である。

本発明者らは蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相に固定化する方法として、蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製して利用することを考えた。この目的のために、糖鎖還元末端付近の構造-すなわちコア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ない

10

20

30

40

50

タンパク質に結合させた人工抗原を発明した。適用例として、複合糖質の中でもっとも研究の進んでいる糖タンパク質のN-型糖鎖コア構造を選び、ピリジルアミノ標識糖鎖を固定化するための最適な抗原を考案した。動植物に存在するN-型糖鎖の代表的なコア構造3種類と免疫する動物の血清アルブミンを用いて抗原を調製し、目的の抗体試薬を調製することに成功し、糖鎖固定化試薬の有効性が証明された。この調製原理は糖タンパク質のN-型糖鎖のみならず、糖タンパク質のO-型糖鎖、糖脂質糖鎖、多糖類、遊離オリゴ糖鎖から誘導した、蛍光物質をはじめとする種々の低分子標識糖鎖の固定化にも適用可能であり、精製糖鎖と糖鎖認識物質の相互作用研究に有用である。

すなわち、本発明の方法は、抗体試薬が、コア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクロ-ナル抗体またはモノクローナル抗体である態様を特徴とする。

10

【0010】

ポリクロ-ナル抗体またはモノクローナル抗体の作成は、ジN-アセチルキトビオース(GlcNAc₂)をはじめとするオリゴ糖鎖の基幹構造の蛍光標識物を、免疫する動物の血清アルブミンをはじめとする免疫原性の少ないタンパク質に共有結合させた人工糖タンパク質抗原を調製し、これを動物に免疫して作成してポリクロ-ナル抗体およびモノクローナル抗体を作成する。

それらのイムノグロブリン分子、ならびにイムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体より選ばれる抗体試薬を用いて蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相化する。すなわち、本発明の方法は、抗体試薬が、上記の人工抗原のイムノグロブリン分子、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれる態様を特徴とする

20

【0011】

本発明の方法は、これらの抗体試薬を用いて蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相表面に固定化することを特徴とする蛍光標識したオリゴ糖鎖を固相に固定化する方法である。好ましくは上記の抗体試薬を用いて、2-アミノピリジンおよびその誘導体を用いて蛍光標識したオリゴ糖鎖をマイクロタイタ-プレート、高分子膜、クロマトグラフィー用支持体、センサーチップの金表面など、固相表面に固定化することを特徴とする。

30

【0012】

また、本発明は、蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬に関する。すなわち、コア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を調製し、これを動物に免疫して作成したポリクロ-ナル抗体またはモノクローナル抗体よりなる蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬の態様を好ましいものとする。また、上記の人工抗原が、イムノグロブリン分子のみならず、イムノグロブリンからプロテアーゼ処理により生じるF(ab')₂フラグメント、グリコシダーゼ処理により生じる脱グリコシル化フラグメント、および該抗体分子やフラグメントの化学的重合体、またはアクリルアミドなど高分子との共重合体からなる群より選ばれるものである蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬の態様を好ましいものとする。

40

【0013】

本発明の詳細を実施例で説明する。本発明はこれらの実施例によって何ら限定されることはない。

【実施例1】

【0014】

《抗原の調製(図3参照)》

まずハプテンとして次の3種類のPA化オリゴ糖鎖を調製した。

50

(1) GlcNAc 1-4GlcNAc-PA (GlcNAc₂-PA).

市販のジN-アセチルキトビオース；(GlcNAc₂)を既報の手順〔TaKaRa PALSTATION mode I 4000のプロトコール、またはHase, S. et al., Agric Biol. Chem., 54, 2169-2170 (1990)〕に従ってピリジルアミノ化して調製した。2-アミノピリジンはヘキサンにより再結晶したものを使用した。

抗原の調製の概略は以下のとおりである。

0.5mgのN,N'-ジアセチルキトビオースにカップリング試薬の2-アミノピリジン溶液(1.5g/500μl AcOH) 472μlを加え、TaKaRa PALSTATION mode I 4000を用いて反応を行った。まず90、60分間加熱して、シッフ塩基を形成し、ポランジメチルアミン錯体溶液(100mg/500μl AcOH) 472μlを加え、80、60分間還元反応を行った。反応溶液にトリエチルアミン：メタノール(=1:1)溶液を40μl加え良く攪拌し、さらにトルエンを80μl加え、60で10分間窒素気流下で濃縮乾固した。この操作を2回くり返した後、残渣にメタノール20μlを加え、60で10分間窒素気流下で濃縮乾固した。液量が微量になるまで繰り返した後、残渣にトルエンを50μlを加え、60で10分間窒素気流下で濃縮乾固した。さらに2-アミノピリジンを完全に除くために10mM NH₄HCO₃を溶媒としてSephadex G-10カラム(1×27cm)上でゲル濾過を行った(Hase, S. et al., Agric Biol. Chem., 54, 2169-2170 (1990))。流速は1drop/30secで、1mlずつ分取し、検出は280nmにおける吸光度の測定(JASCO U-best-55)で行った。GlcNAc₂-PA画分を集めて遠心濃縮機で脱塩した後、溶液をpH 4~5に調節し、310nmにおける吸光度の測定を行った。A₃₁₀=1.0の時 0.17μmol/mlとしてPA化糖鎖の濃度を計算した(高橋禮子 化学と生物 実験ライン20 糖タンパク質と糖結合タンパク質 (1992)廣川書房)。

10

20

【0015】

(2) Man 1-6(Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc-PA (Man₃GlcNAc₂-PA)およびMan 1-6(Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc-PA；(Man₃FucGlcNAc₂-PA)。

ヒトトランスフェリンからHohnen Hydraclubのプロトコールに従ってヒドラジン分解を行い、遊離した糖鎖混合物をPA化し(Hase, S. et al., Agric Biol. Chem., 54, 2169-2170 (1990))、二次元糖鎖マップ法の条件下での逆相HPLC(高橋禮子 化学と生物 実験ライン20 糖タンパク質と糖結合タンパク質 (1992)廣川書房)によって糖鎖構造毎に分離した。主要糖鎖をさらにグリコシダーゼ処理することによって上記の2種類の糖鎖を調製した。または市販品の上記糖鎖を購入した。

30

【0016】

(3) Man 1-6(Man 1-3)(Xyl 1-2)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc-PA；(Man₃XylFucGlcNAc₂-PA)。

エンジュレクチン(Ueno M. et al., J. Biol. Chem., 266, 3146-3153(1991))よりヒドラジン分解により遊離したオリゴ糖鎖をPA化し逆相HPLC(高橋禮子 化学と生物 実験ライン20 糖タンパク質と糖結合タンパク質 (1992)廣川書房)によって分離した主要糖鎖を用いた。

【0017】

上記(1)~(3)のPA-オリゴ糖鎖約500 pmolを100μlの蒸留水に溶解し、0.037%メタ過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₄)を15μl加え、4で18時間、過ヨウ素酸酸化を行い、エチレングリコールを50 pmol加えて反応を停止させた。次にウサギ血清アルブミン(RSA) 1mgを加え、1M NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 8.3)を反応液体積の5分の1体積加えて終濃度が0.2Mとした。NaCNBH₃を2mg加えて4で7日間振盪し、シッフ塩基を還元した。限外ろ過ユニット(分画分子量 10,000の膜をもつ遠心式または固定式ユニット、Milipore社)を用いて、反応溶液の溶媒を滅菌濾過処理した生理食塩水に置換した。PA基を最外部にもつ人工糖タンパク質(RSA-GlcNAc₂-PA, PA-Man₃XylFucGlcNAc₂-RSA, およびPA-Man₃FucGlcNAc₂-RSA)を得た(図4)。

40

RSAに結合したGlcNAc₂-PAの量は、反応溶液から限外濾過の濾液のA280を引いて概算した。その結果、結合したGlcNAc₂-PAは、RSA1モル当り4~8モルと計算された。

【0018】

50

《抗体 の 作成》

(1) ウサギへの免疫

RSA-GlcNAc₂-PA (RSA-GlcNAc₂-PA=8.3:1)の生理食塩水溶液120 μ l (RSAとして100 μ gを含む)にアジュバント(TiterMax Gold, CytRx社) 120 μ lをよく混和させたものを100 μ lずつ、ウサギの左右大腿筋に注射し、その後3週間毎に同様に100 μ lずつ追加免疫した。2度目の免疫の1週間後から1~2日間隔でウサギの耳より血清分離剤入りスピッツ管(栄研器材株式会社)に採血し、抗RSA-GlcNAc₂-PA抗血清を得た。

【0019】

《ELISA法による抗血清の検定》

(1) 抗血漿と免疫前血清との比較

マイクロタイプレートに抗原糖タンパク質(RSA-GlcNAc₂-PA)またはRSA溶液(10 μ g/ml)を50 μ l/wellで加え、4℃で一晩固定化した。ブランクにはPBSを用いた。PBS 200 μ l/wellで3回洗浄後、3% BSA / PBS (200 μ l/well)を加え、4℃で2時間ブロッキングを行った。1次抗体としてウサギ抗RSA-GlcNAc₂-PA抗血清または免疫前血清の2倍希釈列(2⁻¹~2⁻¹²) 100 μ l/wellを加え、室温で1時間反応させた。PBS 200 μ l/wellで3回洗浄し、3% BSA/PBS (200 μ l/well)で4℃、一晩ブロッキングした。2次抗体のHRP-ヤギ抗ウサギIgG抗体を100 μ l/well加え、室温で1時間反応させた後、PBSで4回洗浄し、OPD/H₂O₂を200 μ l/well加えて発色させた。2M H₂SO₄ 50 μ l/wellで停止し、BIO-RAD Model 3550 Microplate Readerを用いて490nmの吸光度を測定した。

10

その結果、図5に示すように、抗血清は抗原人工糖タンパク質(RSA-GlcNAc₂-PA)とコントロールのRSAに対して濃度依存的に結合しているが、その結合量には差が見られた。一方、免疫前血清は抗原、RSAともにほとんど反応性を示さなかった。

20

【0020】

(2) 抗血清の力価測定

初回免疫から31, 34, 36, 39, 41, 52, 54, 56, 60日後に採血したウサギ抗RSA-GlcNAc₂-PA抗血清を用いて、4倍希釈列(4⁻³~4⁻⁶)を作り、上記の(1)と同様にして測定した。どの抗血清も1000倍希釈でも抗原反応性が検出可能(A₄₉₀>0.1)であることが示された。

【0021】

《プロテインAセファロースによるIgGの精製》

ウサギ抗RSA-GlcNAc₂-PA抗血清 12mlを0.45 μ mのフィルターに通し、あらかじめ0.1M クエン酸-リン酸緩衝液(CPB, pH 3.5, およびpH 4.5)で洗浄し、20mM PB (pH 7.3)で平衡化したプロテインAカラム(HiTrap proteinA column; 1ml, Pharmacia)にかけた。20mM PB (pH 7.3)で十分洗浄後、0.1M CPB (pH 4.5)で流速約1ml/min、1ml/フラクションでIgGを溶出し、0.1M CPB (pH 3.5)で完全に溶出した。あらかじめエペンドルフチューブに1M TBS (pH 9.0) 200 μ lを加えておき、溶出液を中和した。280nmにおける吸光度を測定することによりIgGを検出した。A₂₈₀=1.35の時、1mg/mlとしてタンパク濃度を計算した(3)。

30

その溶出曲線を図6に示す。A280の測定はハーフセルで行った。抗血清23mlよりIgG 34.5mgが精製され、このIgG画分をELISAおよび次のF(ab')₂フラグメントの調製に用いた。

40

【0022】

《F(ab')₂の調製》

抗体自身の糖鎖による反応性の妨害を抑えるためにIgGフラクションからペプシン消化を行い、Fc領域を除いたF(ab')₂フラグメントを調製した。これに先立ってIgG中の特異抗体の割合を高めるため、RSA認識抗体を除去した。RSAをホルミルSepharoseに還元アミノ化によって固定化して(5)RSA-Sepharoseカラムを調製し、IgGをこのカラムに通して素通り画分を集め、RSAを認識・結合するIgG画分を除去した。

(1) ペプシン消化

RSA-Sepharoseカラムからの素通りのIgG画分を濃縮した溶液(3.9mg / 550ml AcONa buffer (pH 4.5))に、ペプシン50mgを加え37℃, 20時間消化した。

50

(2) N-グリカナーゼ消化

ペプシン消化後のフラグメントについて、さらにN-グリカナーゼ消化を行った。F(ab')₂ 0.62mg/190μl PBS (pH 7.4) にN-グリカナーゼ(ロシュ・ディアグノスティクス)5unitを加えて37℃で3日間消化した。

(1)と(2)でそれぞれ消化前後のIgGをSDS-PAGEにかけ、PVDF膜に転写して、ウエスタンブロッティングにより限定分解を確認した。図7に示すように、中央のConA染色の結果より、酵素消化しF(ab')₂フラグメントにすることで、抗体の糖鎖が大部分除去されたことが分かったが、F(ab')₂にはまだ糖鎖が残っており、N-グリカナーゼ消化によっても完全には無くならなかった。抗F(ab')₂抗体との反応性より、F(ab')₂フラグメントの生成が確認された。

10

【実施例2】

【0023】

《ポリクロ-ナルウサギIgG抗体を用いて固定化したPA化糖鎖とレクチンとの相互作用解析(ELISA法)》

(1) GlcNAc₂-PAとPVLとの反応性

マイクロタイタープレートに実施例1で精製したIgG(10μg/ml)を100μl/wellを4で一晩固定化し、GlcNAc₂-PA 100μlを加えて室温で1時間反応させた後、3% BSA / PBS で室温で1時間ブロッキングした。Biotin-PVL (10μg/ml)を100μl加え、室温で1時間反応させ、PBSで洗浄(300μl/well×2回)し、3% BSA/PBS (300μl/well)で室温で1時間ブロッキングした。ABC-HRP(1800倍希釈)を100μl/wellを加え室温で1時間反応させた後、PBS 300μlで3回洗浄し、OPD/H₂O₂ 200μlで発色させ、2M H₂SO₄ 50μlを加えて停止し、490nmの吸光度を測定した。

20

【0024】

(2) エンジュレクチン(Sophoragrin)主要糖鎖とConAとの反応性

マイクロタイタープレートに実施例1で精製したIgG(10μg/ml)を100μl/well加え、4で一晩固定化し、PBS(0.05% Tween20)で洗浄した。PA-Sophoragrin major 糖鎖100μl加えて室温で1時間反応させた後、3% BSA/PBSで4で一晩ブロッキングした。Biotin-ConA 100μlを加え、室温で1時間反応させた。以降の洗浄、ブロッキング、発色および測定操作は上記の(1)と同様に行った。

【0025】

<結果>

作成した抗糖鎖抗体の実用性を見るために、精製したRSA-GlcNAc₂-PA-IgGによりPA化糖鎖を固定化してレクチンとの反応性をELISAで調べた。ブランクをPA化糖鎖なしに設定した。使用したレクチンの特異性を表1にまとめて示した。GlcNAc₂-PAとPVLとの反応性について調べた結果を図8に示した。濃度依存的に結合量が増加していることから、作成した抗体によってPA化糖鎖を固定化することが出来たことが示された。

また同様にPA-Sophoragrin 主要糖鎖-ConAとの反応性について調べた。図9に示すように、PA-糖鎖の濃度依存的に結合量が増加していることから、糖鎖を固定化することが出来たことが示されたが、バックグラウンドの値も非常に高くなってしまった。これは抗体自身のもつ糖鎖が主にConA結合性の複合型2本鎖であること(Taniguchi et al., Biochemistry, 24, 5551-5557(1985))による可能性が考えられる。

30

40

【0026】

【表 1】

レクチン	糖結合特異性
PVL ¹⁾ (ムジナタケ レクチン)	・非還元末端 β -GlcNAc ・N-アセチルノイラミン酸クラスター
ConA (コンカナバリンA)	・オリゴマンノース型 ・二本鎖複合型

10

1) Ueda, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 24916-24925 (2002)

→ PVL調製はUeda, H. *et al.*, *FEBS Lett.* **448**, 75-80 (1999)の方法により行った。

【実施例 3】

【0027】

20

《F(ab')₂により固定化したPA化糖鎖とレクチンとの反応性の測定(ELISA法)》

(1) GlcNAc₂-PAとPVL およびConAとの反応性

マイクロタイタープレートに実施例1で調製したF(ab')₂、N-Glycanase 消化F(ab')₂、およびintact IgG(各10 μ g/ml)をそれぞれ100 μ l/wellで4で一晚固定化した。各ウエルにGlcNAc₂-PA 100 μ l/wellを加えて室温で1時間反応させた後、ブロッキングし、biotin-PVL またはbiotin-ConA 100 μ lを加え、室温で1時間反応させた。以降の洗浄、ブロッキング、発色および測定操作は実施例2と同様に行った。

【0028】

F(ab')₂フラグメントによりPA化糖鎖を固定化してレクチンとの反応性を検出した。GlcNAc₂-PAとPVLとの反応性について調べた結果を図10に示した。0-20pmol/wellのGlcNAc₂-PAの濃度範囲で糖鎖の濃度依存的な結合が示された。またF(ab')₂フラグメントにすることでバックグラウンドの高さを改善できた。

30

同様の方法でGlcNAc₂-PAとConAとの反応性について調べた結果を図11に示した。F(ab')₂フラグメントにすることで、1 pmolのPA化糖鎖でも高感度に検出することができた。さらにN-グリカナゼ消化したF(ab')₂フラグメントを用いることによりバックグラウンドの値をより低下させることができたが、同時にPA化糖鎖の検出感度(ブランクとの吸光度差)も低下した。これはF(ab')₂に存在するN-型糖鎖が抗原認識に関与しているためと考えられる。

【0029】

《抗原糖鎖とF(ab')₂との親和性》

40

抗原に使用したGlcNAc₂-PAとF(ab')₂との親和性を、BIACORE 2000を使用して表面プラズモン共鳴法(SPR)により測定した。CM5センサーチップにBIACOREの標準プロトコールに従って、F(ab')₂またはIgGをEDC/N-ヒドロキシスクシンイミドを用いて固定化し、残存活性基をエタノールアミンでブロックした。コントロールとしてはBSAを同じ方法でフローセルに固定化して用いた。F(ab')₂、IgGおよびBSAのフローセルへの固定化量をそれぞれ、表1に示した。アナライトとしてGlcNAc₂-PA溶液(50-600 pmol/ml)またはGlcNAc₃-PA溶液(1-36 pmol/ml)を10 ml/minの流速で25で流して、結合と解離を測定した。

【0030】

結果

F(ab')₂固定化セルへの結合からコントロールセルへの結合を差し引いた結合量(RU: re

50

sonance unit) を図 1 2 に示す。PA化糖鎖の濃度依存的にF(ab')₂フラグメントへの結合が観測された。この結果から、BIA evaluation 3.1ソフトを用いて、グローバルフィッティングにより、解離定数K_Dを求めたところ、約10⁻⁹ ~ 10⁻¹⁰MのK_D値が得られ、高い親和性でPA-糖鎖と結合することが示された。F(ab')₂、およびIgGに対するGlcNAc₂-PA、GlcNAc₃-PAのKDを表 2 にまとめた。

【表 2】

PA-オリゴ糖鎖	抗体(固定化量, RU)	結合速度定数 (k _a , 1/M·s)	解離速度定数 (k _d , 1/s)	解離定数 (K _d , 1/M)
PA-GlcNAc ₂	IgG (7500)	9.5x10 ³	2.6x10 ⁻⁶	2.7x10 ⁻¹⁰
PA-GlcNAc ₂	F(ab') ₂ (2200)	1.4x10 ⁴	2.2x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻⁹
PA-GlcNAc ₃	IgG (9900)	4.7x10 ⁴	1.6x10 ⁻⁴	3.5x10 ⁻⁹

10

20

【 0 0 3 1 】

以上の結果から、IgG、ならびにIgGから調製したF(ab')₂フラグメントは、PA化糖鎖と特異的に結合し、マイクロタイタ-プレートなどの固相表面にPA化糖鎖を固定化して、相互作用解析を行う目的に利用できることが示された。SPRの結果から解離速度がかなり速いことが示されたので、解離速度を小さくしてより強い結合試薬とするため、化学的な重合操作による親和性の向上をはかることができる。この方法としては、ペプチド中のアミノ基をグルタルアルデヒドなどの二価架橋試薬により架橋することによるIgG分子またはF(ab')₂の重合、直鎖状のポリアクリルアミドやメチルビニルエーテル/無水マレイン酸コポリマー(商品名: Gantrez AN119、五協産業)などにIgGまたはF(ab')₂を多数結合させ、多価の効果で親和性の向上をはかることが考えられる。またFc領域の糖鎖を利用して、IgG分子同士を重合させる方法は親和性の向上と同時に抗体自身の糖鎖によるバックグラウンドの高さを低下させるため、有効と考えられる。

30

【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 2 】

糖機能の探求活動に欠かすことができないのが、糖と糖レセプター等の標的物との相互作用を測定し、相互作用を定量的に解析することである。

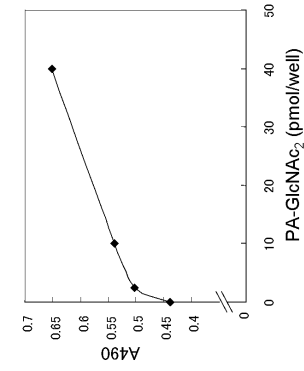
本発明者らは蛍光標識糖鎖に化学変化を加えずにそのまま固相に固定化する方法として、蛍光標識糖鎖のみを認識して結合する特異的な抗体試薬を調製して利用することを考えた。この目的のために、糖鎖還元末端付近の構造 - すなわちコア構造の2~7糖に蛍光標識基を結合させ、この蛍光標識基を溶液中に露出した状態になるように、抗原性の少ないタンパク質に結合させた人工抗原を発明した。適用例として、複合糖質の中でもっとも研究の進んでいる糖タンパク質のN-型糖鎖コア構造を選び、ピリジルアミノ標識糖鎖を固定化するための最適な抗原を考案した。動植物に存在するN-型糖鎖の代表的なコア構造3種類と免疫する動物の血清アルブミンを用いて抗原を調製し、目的の抗体試薬を調製することに成功し、糖鎖固定化試薬の有効性が証明された。この調製原理は糖タンパク質のN-型糖鎖のみならず、糖タンパク質のO-型糖鎖、糖脂質糖鎖、多糖類、遊離オリゴ糖鎖から誘導した、蛍光物質をはじめとする種々の低分子標識糖鎖の固定化にも適用可能であり、精製糖鎖と糖鎖認識物質の相互作用研究に有用である。

40

【図面の簡単な説明】

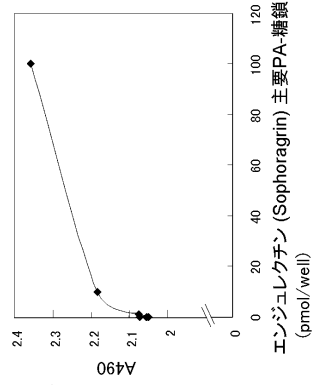
50

【 図 8 】

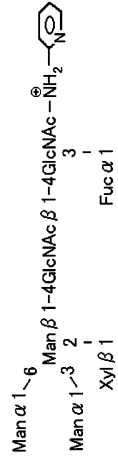


- マイクロタイタープレート
- ↓ IgG固定化(10 µg/ml)
- ↓ PBS洗浄
- ↓ PA-GlcNAc₂と結合反応
- ↓ 3% BSAブロック
- ↓ ビオチン標識PVLと結合反応
- ↓ 洗浄
- ↓ ブロック
- ↓ ABC-HRP
- ↓ 洗浄
- ↓ OPD, H₂O₂発色
- ↓ 490 nm

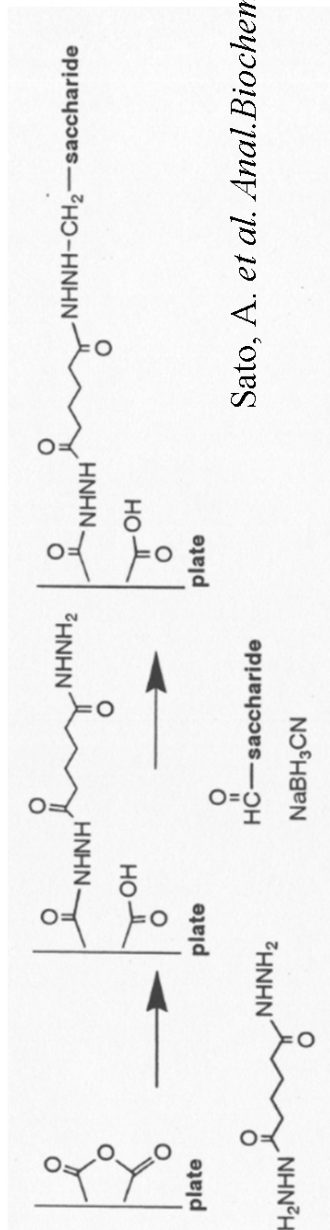
【 図 9 】



- マイクロタイタープレート
- ↓ IgG固定化 (10 µg/ml)
- ↓ PBS洗浄
- ↓ エンジュレクチン (Sophoragrin) 主要PA-糖鎖と結合反応
- ↓ 3% BSAブロック
- ↓ ビオチン標識ConAと結合反応
- ↓ 洗浄
- ↓ ブロック
- ↓ ABC-HRP
- ↓ 洗浄
- ↓ OPD, H₂O₂発色
- ↓ 490 nm

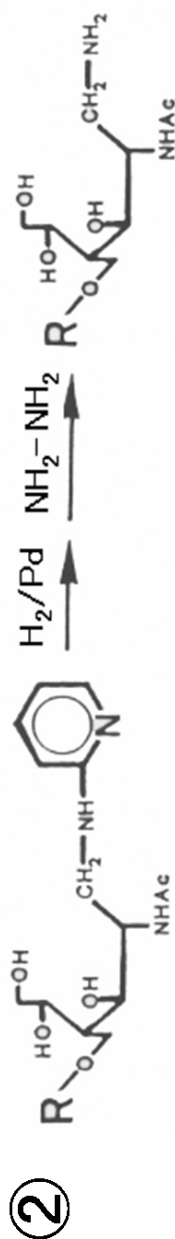


<エンジュレクチン (Sophoragrin) 主要PA-糖鎖>



Sato, A. *et al. Anal.Biochem.* **260**, 96-102 (1998)

————— 遊離-CHO 基が必要, 糖鎖に対する感度 ≥ 200 pmol/ ウエル



Hase, S. *et al. J.Biochem.* **112**, 266-268 (1992)

③ ネオ糖脂質およびネオ糖タンパク質への誘導化

————— 遊離-CHO 基が必要



1. PA-GlcNAc₂,



2. PA-Man₃XylFucGlcNAc₂

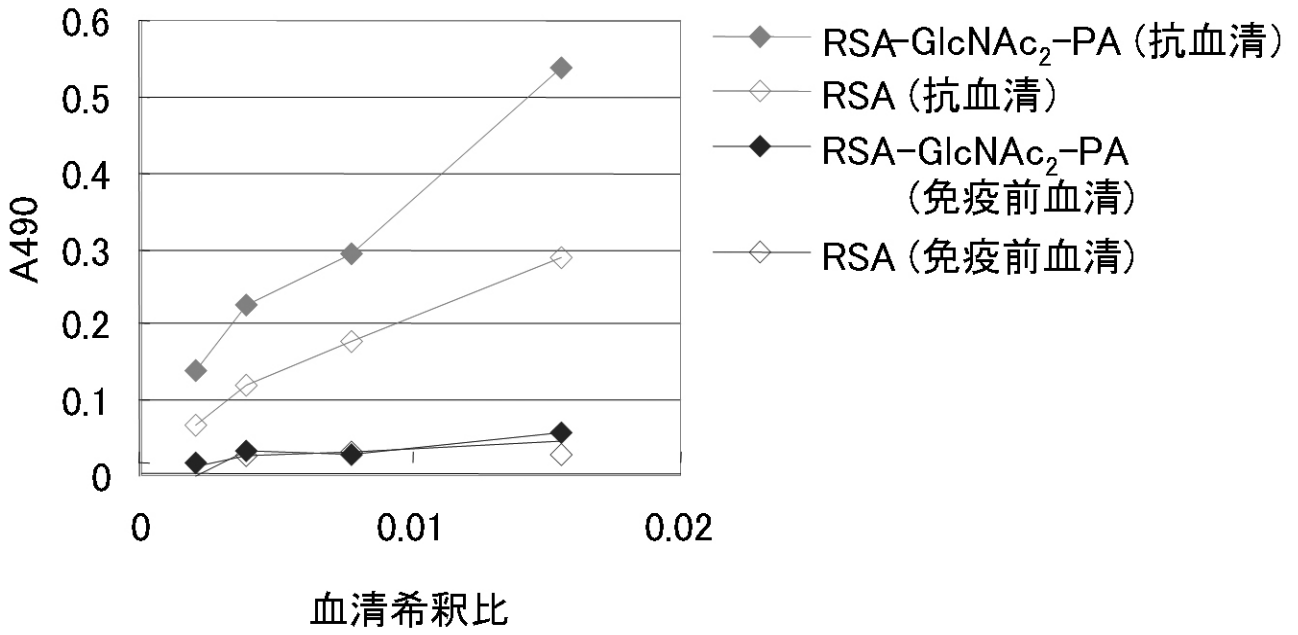


3. PA-Man₃GlcNAc₂,

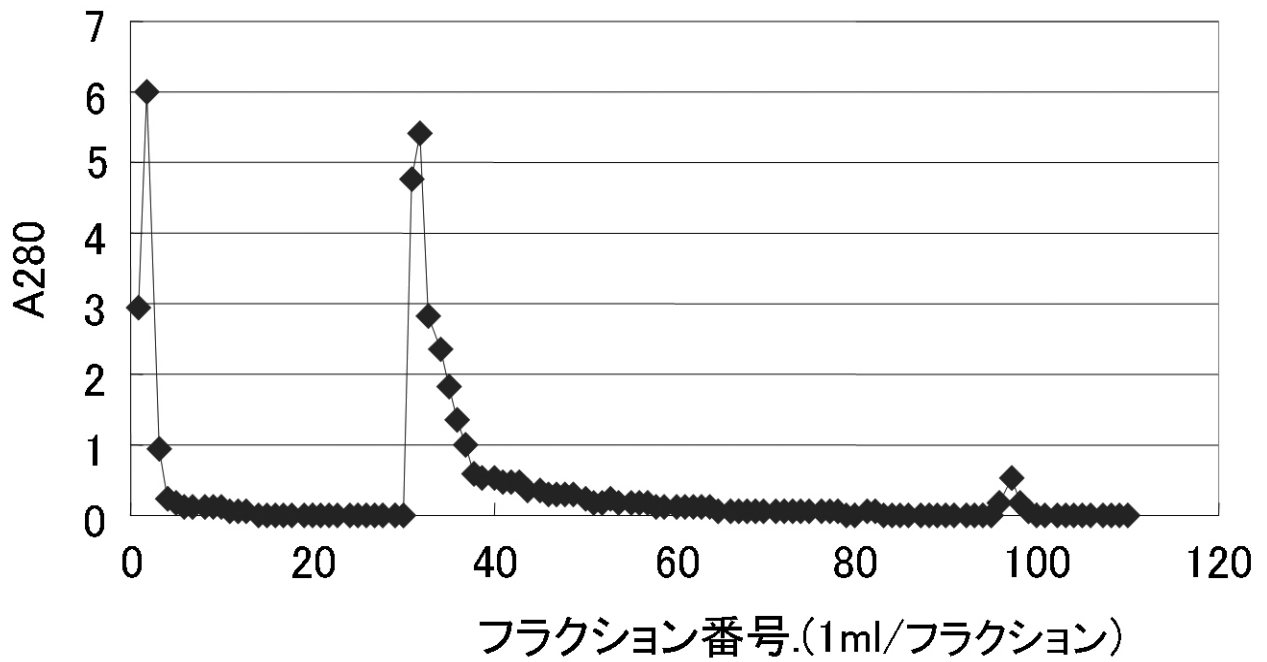


4. PA-Man₃FucGlcNAc₂

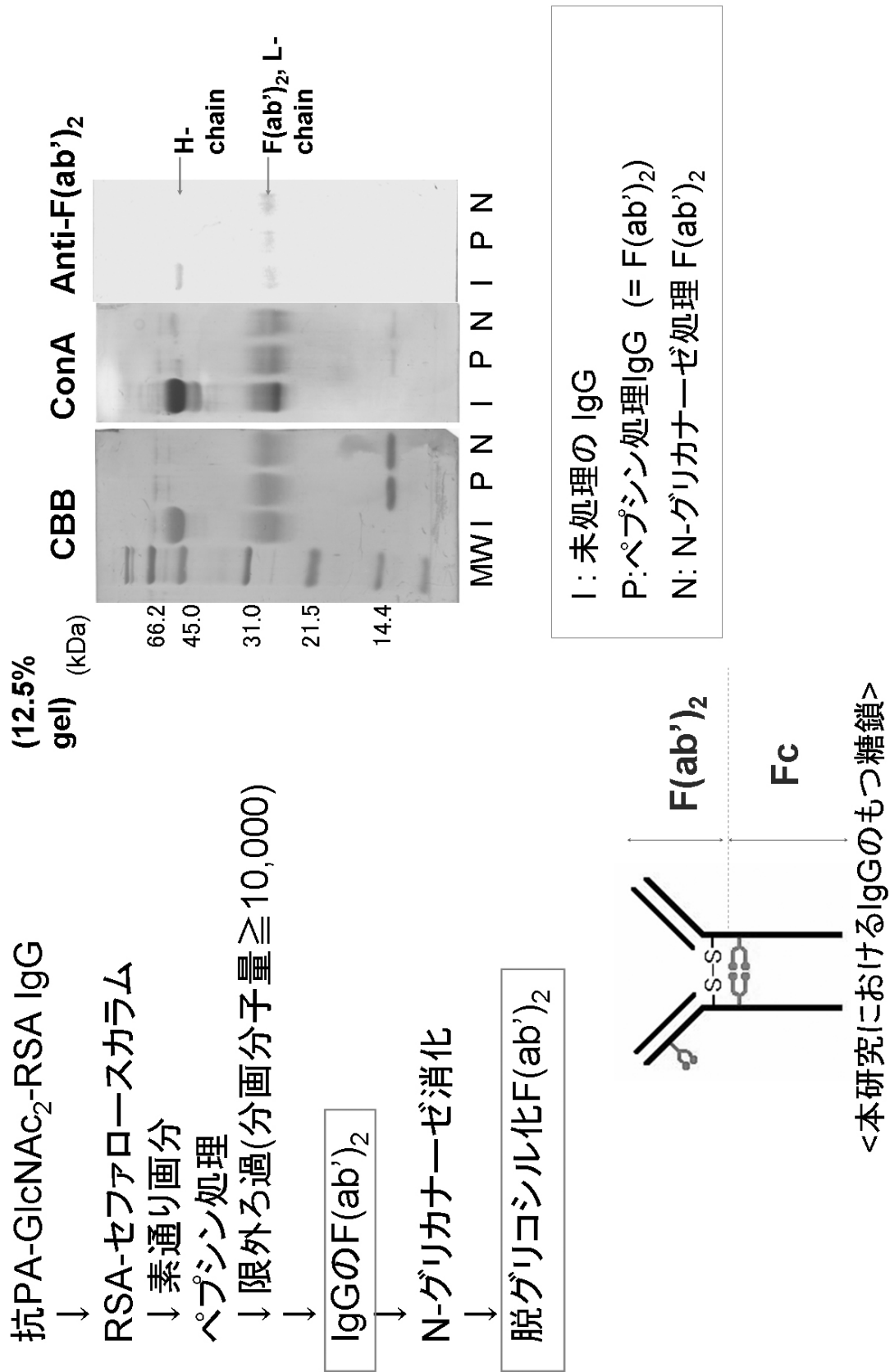
【図5】



【図6】

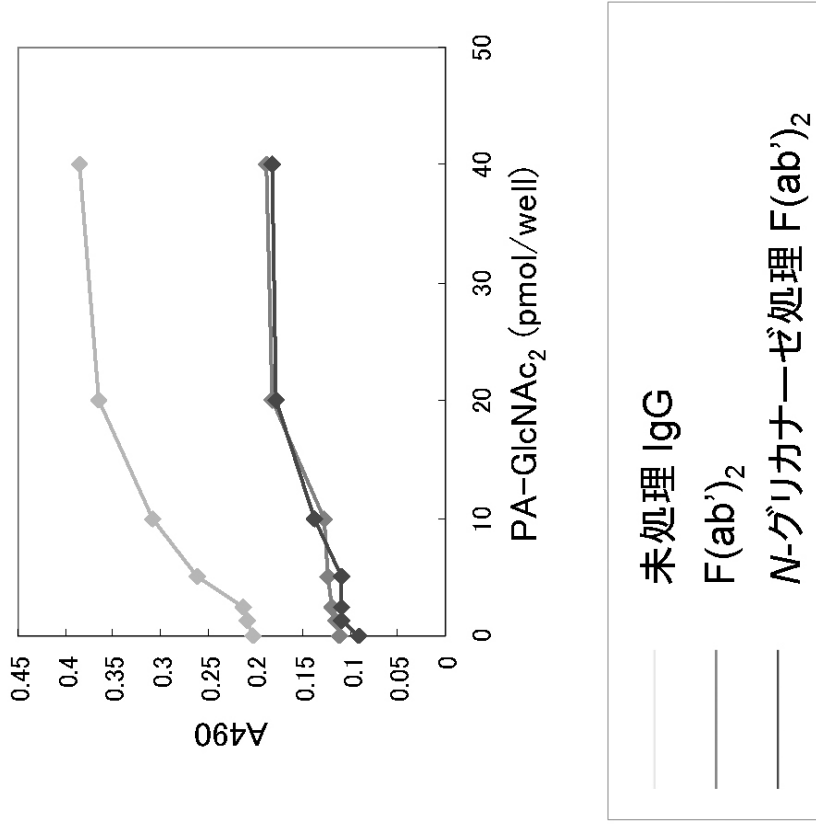


【 図 7 】



【 図 1 0 】

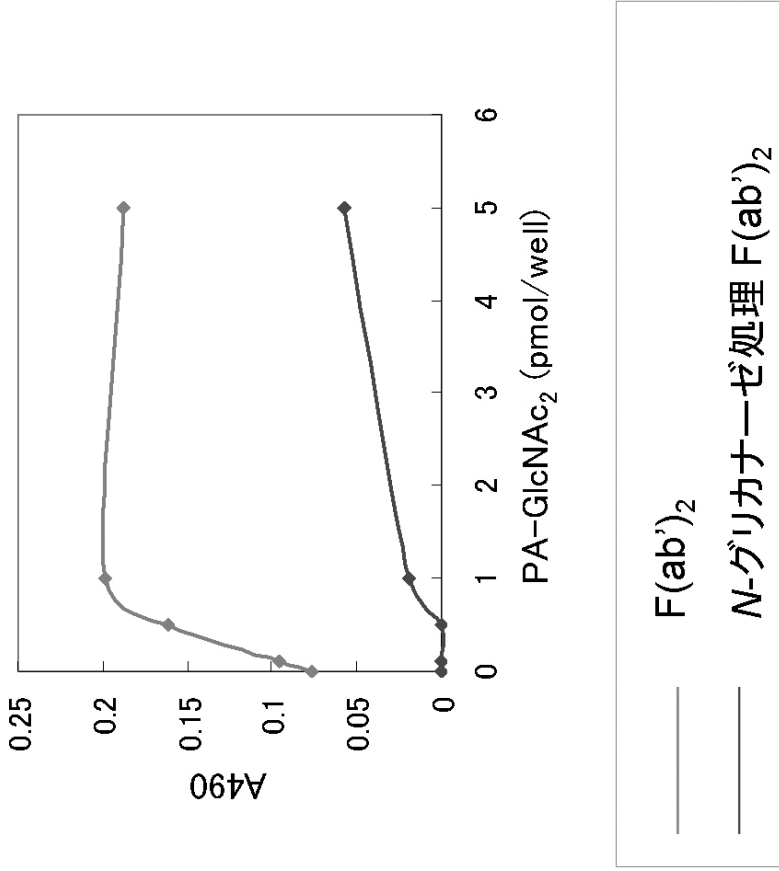
マイクロタイタープレート
 ↓ F(ab')₂ 固定化
 ↓ 3% BSA ブロック
 ↓ PA-GlcNAc₂ と結合反応
 ↓ PBS 洗浄
 ↓ ブロック
 ↓ ビオチン標識PVLと結合反応
 ↓ 洗浄
 ↓ ブロック
 ↓ ABC-HRP
 ↓ 洗浄
 ↓ OPD, H₂O₂ 発色
 ↓ 490 nm



< ELISAによるPA-GlcNAc₂ とPVLとの反応性 >

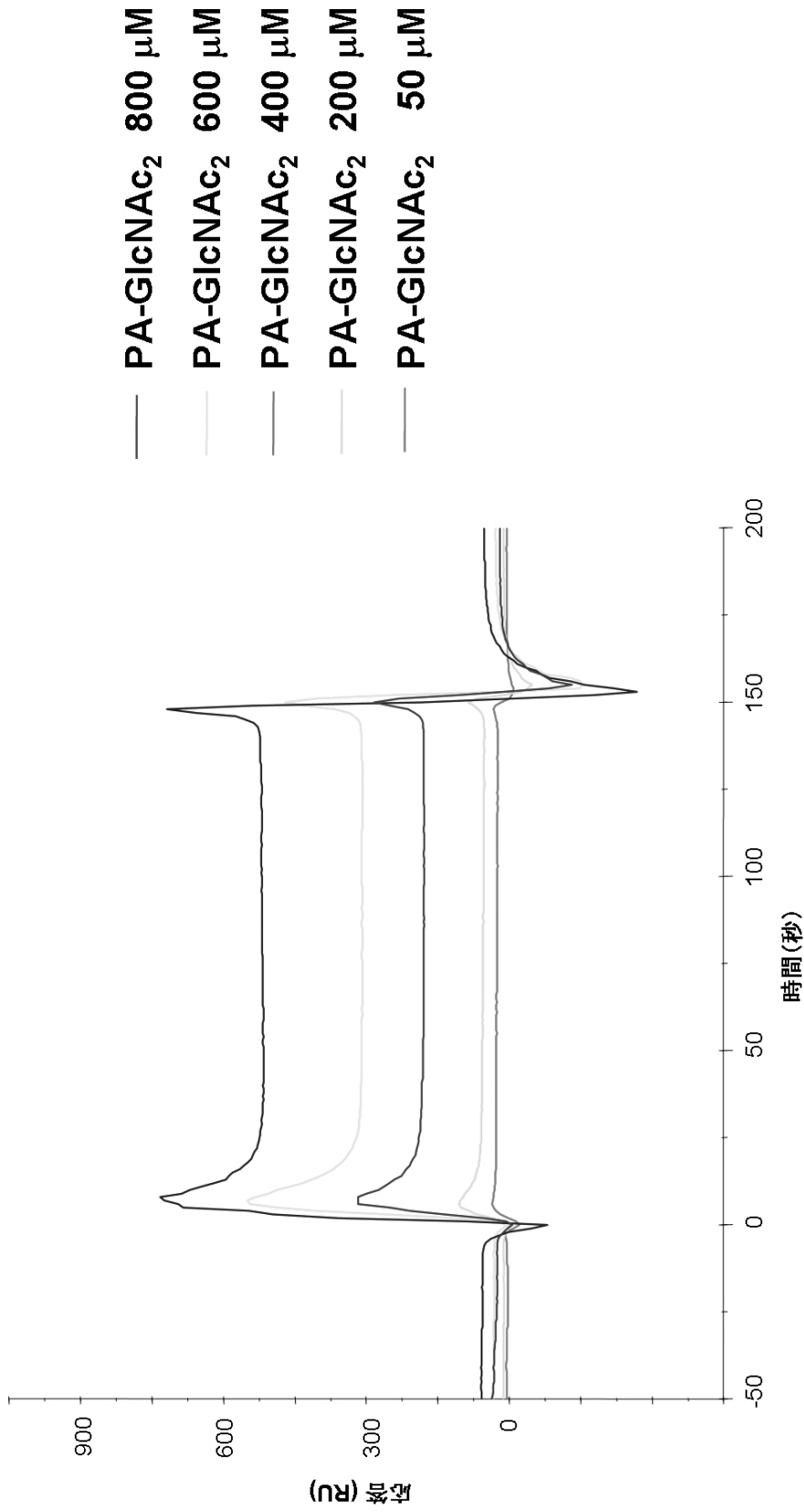
【 図 1 1 】

- マイクロタイタープレート
- ↓ F(ab')₂固定化
- ↓ 3% BSAブロッック
- ↓ PA-GlcNAc₂と結合反応
- ↓ PBS洗浄
- ↓ ブロック
- ↓ ビオチン標識ConAと結合反応
- ↓ 洗浄
- ↓ ブロック
- ↓ ABC-HRP
- ↓ 洗浄
- ↓ OPD, H₂O₂発色
- ↓ 490 nm



<ELISAによるPA-GlcNAc₂ とConAとの反応性>

【 図 1 2 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/577

F I

G 0 1 N 33/577

B

テーマコード(参考)

【要約の続き】

专利名称(译)	荧光标记糖链的特异性固定化试剂和固定化方法		
公开(公告)号	JP2005241389A	公开(公告)日	2005-09-08
申请号	JP2004050592	申请日	2004-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	御茶水女子大学长度		
申请(专利权)人(译)	御茶水女子大学长度		
[标]发明人	小川温子		
发明人	小川 温子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N33/533 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.S G01N21/78.C G01N33/533 G01N33/545.A G01N33/553 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G054/AA10 2G054/AB10 2G054/CA25 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：荧光标记糖链固定化技术的开发，旨在分析与糖链配体的相互作用 解决方案：制备仅识别和结合荧光标记糖链的特异性抗体试剂，使用这些抗体试剂将荧光标记糖链原样固定在固相表面上，而无需化学变化。一种将荧光标记的寡糖链固定在固相上的方法，该方法包括：抗体试剂将荧光标记基团结合到糖蛋白或糖脂糖链核心结构的2-7个糖上，并且将该荧光标记基团结合到具有低抗原性的蛋白质上，从而使其暴露于溶液中。它是通过用制备的人工抗原免疫动物而制备的多克隆抗体或单克隆抗体。抗体试剂是上述人工抗原的免疫球蛋白分子，通过蛋白酶处理从免疫球蛋白产生的F (ab') 2片段，通过糖苷酶处理产生的去糖基化片段，以及抗体分子或片段的化学聚合物，或它选自与聚合物如丙烯酰胺的共聚物。 [选型图]图1

