

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/018225

発行日 平成21年2月19日(2009.2.19)

(43) 国際公開日 平成19年2月15日(2007.2.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58 Z	2 GO 4 5
CO 7 F 3/06 (2006.01)	CO 7 F 3/06 CSP	4 CO 7 1
CO 7 D 495/04 (2006.01)	CO 7 D 495/04 IO 3	4 HO 4 8
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2007-529601 (P2007-529601)	(71) 出願人	000113780 マナック株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/315705		広島県福山市箕沖町92番地
(22) 国際出願日	平成18年8月9日(2006.8.9)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	特願2005-230583 (P2005-230583)	(74) 代理人	100113653 弁理士 東田 幸四郎
(32) 優先日	平成17年8月9日(2005.8.9)	(74) 代理人	100116919 弁理士 齋藤 房幸
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	小池 透 広島県広島市東区牛田東2丁目19-18
		(72) 発明者	木下 英司 広島県広島市東区牛田本町5丁目4-1-404

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸基を有する物質の染色方法

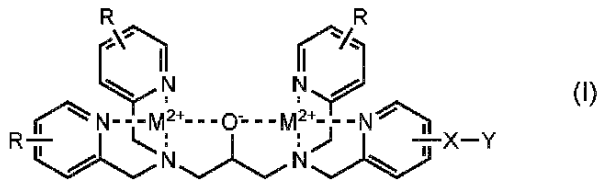
(57) 【要約】

生体試料等からリン酸基を有する物質を容易に検出できる方法、リン酸化アミノ酸残基を簡便に識別する方法、及びリン酸基を有する物質に高い配位結合能を有することから、当該方法で使用でき得る化合物を提供する。一般式(I)：式中、Mは、2価の陽イオンに成り得る金属原子であり、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である}で示される金属錯体化合物は、リン酸基を有する物質に高い配位結合能を有し且つ標識基を有することから、リン酸基を有する物質を容易に特定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

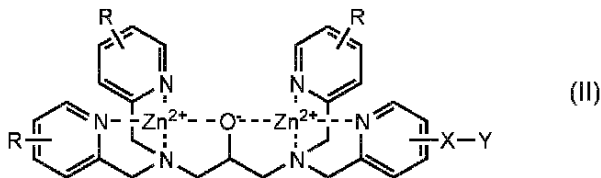
一般式 (I) :



{式中、Mは、2価の陽イオンに成り得る金属原子であり、Rは、相互に同一又は異なっ
ていてもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカ
ルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル
基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキ
ル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16であ
る）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハ
ロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である} で示される金属錯体化合物
を用いることを特徴とする、リン酸基を有する物質の染色方法。

【請求項 2】

一般式 (II) :



{式中、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16である
アルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボ
ニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、
ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアル
キル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基
；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識
基である} で示される亜鉛錯体化合物を用いることを特徴とする、リン酸基を有する物質
の染色方法。

【請求項 3】

標識基がビオチンであることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載のリン酸基を有する物
質の染色方法。

【請求項 4】

請求項 1 記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免
疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法。

【請求項 5】

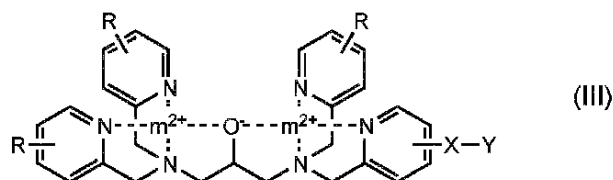
請求項 2 記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免
疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法。

【請求項 6】

請求項 3 記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免
疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法。

【請求項 7】

一般式 (III) :



{式中、mは、2価の陽イオンに成り得る金属原子（但し、亜鉛原子である場合を除く）であり、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である}で示される金属錯体化合物。

10

【請求項8】

標識基がビオチンであることを特徴とする、請求項7記載の金属錯体化合物。

【請求項9】

請求項1の一般式（I）で示される金属錯体化合物を含むことを特徴とする、リン酸基を有する物質の染色剤又は染色助剤。

【請求項10】

20

請求項1の一般式（I）（式中、Yは酵素である）で示される金属錯体化合物、該酵素に対する発色試薬、及び必要により基質を含む、リン酸基を有する物質の染色用キット。

【請求項11】

請求項1の一般式（I）（式中、Yはビオチンである）で示される金属錯体化合物、アビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体が結合した酵素、該酵素に対する発色試薬、及び必要により基質を含む、リン酸基を有する物質の染色用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リン酸基を有する物質の染色方法に関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

ある種の生体内酵素は、活性中心やアロステリック部位を代表とする特定部位にセリンやトレオニン、チロシン残基を有し、これらの水酸基が、キナーゼ等と呼ばれる酵素によりリン酸化されたり或いは脱リン酸化されることによって、酵素活性が調整されている。また、リシン、アルギニン、ヒスチジンのアミノ基或いはイミノ基や、アスパラギン酸、グルタミン酸のカルボキシル基がリン酸化（又は脱リン酸化）されることによって、活性が調整されている酵素もある。このようなリン酸化－脱リン酸化により調整されている代謝系としては、グリコーゲン合成の抑制とその分解系がよく知られている。この代謝系は、主としてリン酸化－脱リン酸化によりカスケード制御され、調整されている。

40

【0003】

そして近年、このリン酸化－脱リン酸化が、疾病に関係する代謝系において重要な役割を有していることが明らかとなってきている。例えば、細胞のガン化は、リン酸化－脱リン酸化の異常が一因であるといわれている。つまり、細胞周期の進行や停止は様々な酵素（タンパク質）のリン酸化（又は脱リン酸化）により制御されており、このリン酸化（又は脱リン酸化）にはサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ（CDK）が関与しているが、斯かるメカニズムが損傷するとリン酸化（又は脱リン酸化）に乱れが生じ、その結果、細胞の異常増殖が引発されることになる。その他にも、プロテインキナーゼCが、アトピー性皮膚炎や花粉症等のアレルギー疾患の原因となるヒスタミンの脱顆粒に関することや、アルツハイマー病患者の脳で発生する神経原繊維変化は、リン酸化されたタウタンパク

50

質によることが明らかにされている。従って、タンパク質のリン酸化-脱リン酸化状況を把握することは、生体組織細胞の遺伝子発現を探索したり、酵素活性評価のみならず、疾病の診断や治療にも役立つ可能性がある。

【0004】

ところが、従来より用いられてきたリン酸化タンパク質（又は脱リン酸化タンパク質）の特定方法には、様々な欠点がある。例えば、酵素免疫法は、対象となるタンパク質試料が微量であっても分析可能という利点があるが、必要な抗体を充分量得ることが困難であり、また、対象タンパク質が数kDa以下である場合には、タンパク質中のリン酸化部位に結合する抗体を調整することができない。また、放射性同位元素³²Pで標識されたリン酸を使用することによって、タンパク質への特異的結合を検出する方法も考えられるが、放射性同位元素の取り扱いには当然に注意が必要であり、廃液の管理や処理まで要求される。

10

【0005】

ところで、非特許文献1には亜鉛錯体が記載されており、当該亜鉛錯体は、二つの亜鉛イオンがジヌクレオチド中のリン酸基（リン酸ジエステル基）に作用し、切断するという機能を有する。しかし、当該文献における当該錯体の機能はあくまで触媒としてのものであり、リン酸基との配位結合能に関しては、一切記載されていない。実際、本発明者らによる実験によれば、当該錯体と2つのヌクレオチド間のリン酸基（リン酸ジエステル基）との解離定数は非常に高い。即ち、リン酸ジエステル基に対する当該錯体の配位結合能は低い。

20

【0006】

また、同じく非特許文献2にも、上記亜鉛錯体と類似の構造を有する鉄錯体が記載されている。しかし、当該鉄錯体は、酸素分子の運搬タンパク質であるヘムエリトリンのモデルとして合成されたものであり、当該鉄錯体とリン酸モノエステル基との配位結合能に関して全く記載も示唆もされていないことは、上記非特許文献1と同様である。

【0007】

一方で、特許文献1及び非特許文献3には、リン酸基を有する物質を捕捉可能な亜鉛錯体として、アルコキシドで架橋された二核亜鉛錯体構造を有する亜鉛錯体が記載されている。また、特許文献2には、リン酸化ペプチドの標識方法が記載されている。しかし、前者の当該亜鉛錯体については、当該亜鉛錯体のみではリン酸基を有する物質を捕捉可能であっても標識することはできない。更に後者のリン酸化ペプチドの標識方法には、ゲル染色、電子スピン共鳴（ESR）及びアフィニティースピンカラムクロマトグラフィーが挙げられ、リン酸化ペプチドの標識方法に使用される亜鉛錯体化合物の標識基には、蛍光発色基、ニトロオキシドラジカル含有基及びビオチンが挙げられており、また、リン酸化ペプチドの標識方法に使用される錯体化合物の金属原子は、亜鉛原子に限定しているが、それ以外の標識方法及び錯体化合物についての具体的な記載はない。加えて、特許文献3及び非特許文献4にも、ビオチンを有する亜鉛錯体を用いた表面プラズモン共鳴（SPR）によるリン酸化ペプチド又はリン酸化タンパク質の検出方法が記載されているが、それ以外の検出方法についての具体的な記載はない。

30

【特許文献1】国際公開第03/053932号パンフレット

40

【特許文献2】国際公開第2004/078724号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2005/038442号パンフレット

【非特許文献1】モリオ ヤシロ、外2名、"Preparation and Study of Dinuclear Zinc (II) Complex for the Efficient Hydrolysis of the Phosphodiester Linkage in a Diribonucleotide", ジャーナルオブザケミカルソサエティ、ケミカルコミュニケーションズ (Journal of the Chemical Society, Chemical Communications), 1995年, p. 1793-1794

【非特許文献2】ヒデカズ アライ、外6名、"A novel diiron com

50

plex as a functional model for hemerythrin", ジャーナル オブ インオーガニック バイオケミストリー (Journal of Inorganic Biochemistry), 2000年, 82巻, p. 153-162

【非特許文献3】エイジ キノシタ、外4名, "Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc (II) complex", ダルトン トランザクションズ (Dalton Transactions), 2004年, p. 1189-1193

【非特許文献4】カズキ イナモリ、外7名, "Detection and Quantification of On-Chip Phosphorylated Peptides by Surface Plasmon Resonance Imaging Techniques Using a Phosphate Capture Molecule", アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry), 2005年, 77巻, p. 3979-3985

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述した状況の下、本発明が解決すべき課題は、リン酸基を有する物質を容易に検出すべく、これを染色する方法及び当該染色方法を利用してリン酸化アミノ酸残基を識別する方法を提供することにある。これに加えて、本発明では、リン酸基を有する物質に対して優れた配位結合能を有し、上記方法に使用できる化合物を提供することも目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

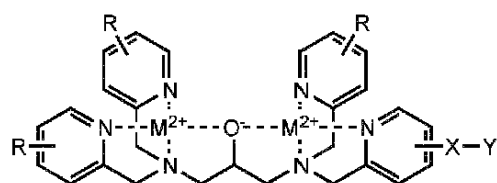
本発明者らは、上記課題を解決すべく、リン酸基を有する物質中のリン酸基（リン酸モノエステル基）に配位可能な金属錯体について鋭意研究を進めたところ、本発明の化合物は、リン酸イオン或いはリン酸モノエステル中の2つの水酸基に対する配位結合能が極めて高く、その結果、リン酸基を有する物質中のリン酸基（リン酸モノエステル基）へ強く配位して、多数の物質を含んだ混合試料中でもリン酸基を有する物質へ特異的に結合して複合体を形成することができ、また、本発明の金属錯体化合物は標識基を有していることから、当該複合体を容易に特定できることを見出して本発明を完成した。

【0010】

即ち、本発明は、

(1) 一般式 (I) :

【0011】



【0012】

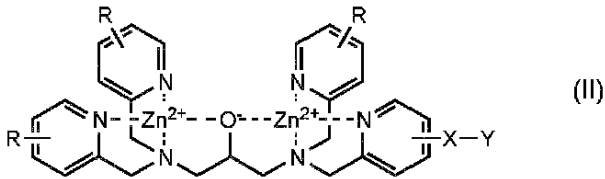
{式中、Mは、2価の陽イオンに成り得る金属原子であり、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である} で示される金属錯体化合物

を用いることを特徴とする、リン酸基を有する物質の染色方法；

【0013】

(2) 一般式 (I I) ；

【0014】



10

【0015】

{式中、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である} で示される亜鉛錯体化合物を用いることを特徴とする、リン酸基を有する物質の染色方法；

【0016】

20

(3) 標識基がビオチンであることを特徴とする、上記(1)又は(2)記載のリン酸基を有する物質の染色方法；

【0017】

(4) 上記(1)記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法；

【0018】

(5) 上記(2)記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法；

【0019】

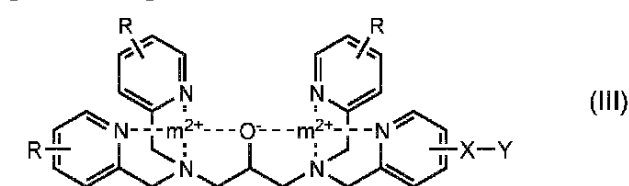
(6) 上記(3)記載のリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることを特徴とする、リン酸化アミノ酸残基の識別方法；

30

【0020】

(7) 一般式 (I I I) ；

【0021】



40

【0022】

{式中、mは、2価の陽イオンに成り得る金属原子（但し、亜鉛原子である場合を除く）であり、Rは、相互に同一又は異なってもよく、水素原子；炭素数が1～16であるアルキル基；アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基（ここで、これらの基のアルキル部分の炭素数は、1～16である）；カルボキシル基；カルバモイル基；シアノ基；ヒドロキシル基；アミノ基或いはハロゲノ基であり、Xは、結合基であり、Yは、標識基である} で示される金属錯体化合物；

【0023】

50

(8) 標識基がビオチンであることを特徴とする、上記(7)記載の金属錯体化合物；

【0024】

(9) 上記(1)の一般式(I)で示される金属錯体化合物を含むことを特徴とする、リン酸基を有する物質の染色剤又は染色助剤；

【0025】

(10) 上記(1)の一般式(I) (式中、Yは酵素である)で示される金属錯体化合物、該酵素に対する発色試薬、及び必要により基質を含む、リン酸基を有する物質の染色用キット；

【0026】

(11) 上記(1)の一般式(I) (式中、Yはビオチンである)で示される金属錯体化合物、アビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体が結合した酵素、該酵素に対する発色試薬、及び必要により基質を含む、リン酸基を有する物質の染色用キットである。

【発明の効果】

【0027】

上記一般式(I)で示される金属錯体化合物は、リン酸基を有する物質へ特異的に結合して複合体を形成することができ、且つ標識基を有していることから当該複合体を容易に特定できるものとして、特に、生化学的研究や病気の診断治療等において非常に有用である。

【0028】

また、上記一般式(II)で示される亜鉛錯体化合物は、中性条件下でリン酸基を有する物質へ特異的に強く結合して複合体を形成することができ、且つ標識基を有していることから当該複合体を容易に特定できるものとして、特に、生理条件である中性条件下で行う生化学的研究や病気の診断治療等において非常に有用である。

【0029】

また、上記一般式(I)又は(II)において、標識基がビオチンである錯体化合物は、取り扱いが容易であり、また、様々な染色方法に応用できることから利便性が高く、リン酸基を有する物質を容易に特定できる。

【0030】

また、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法は一般によく利用されている染色法であるため、上記一般式(I)で示される金属錯体化合物を用いるリン酸基を有する物質の染色方法と組み合わせることで、リン酸化アミノ酸残基を簡便に識別できる。

【0031】

また、上記一般式(II)で示される亜鉛錯体化合物を用いるリン酸基を有する物質の染色方法と、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることで、生理条件である中性条件下でリン酸化アミノ酸残基を簡便に識別できる。

【0032】

また、上記一般式(I)又は(II)において、標識基がビオチンである錯体化合物を用いるリン酸基を有する物質の染色方法と、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることで、利便性が高くなり、リン酸化アミノ酸残基を簡便に識別できる。

【0033】

また、上記一般式(III)で示される金属錯体化合物は、リン酸基を有する物質に対して従来にない配位結合能を示すことから、上記方法で使用できる化合物として有用である。

【0034】

また、上記一般式(III)において、標識基がビオチンである金属錯体化合物は、取り扱いが容易であり、また、様々な染色方法に応用できることから利便性が高く、更に、リン酸基を有する物質に対して従来にない配位結合能を示すことから、上記方法で使用できる化合物として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】実施例2における亜鉛錯体化合物－西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（A）とSYPRO（登録商標）Ruby protein gel stainによる染色後のゲル（B）である。

【図2】実施例3における亜鉛錯体化合物－西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（A）とSYPRO（登録商標）Ruby protein gel stainによる染色後のゲル（B）である。

【図3】実施例4における亜鉛錯体化合物－西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（A）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合抗リン酸化チロシン抗体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（B）、ウサギ抗リン酸化セリン抗体溶液及び西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合抗ウサギ免疫グロブリンG（IgG）抗体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（C）及びSYPRO（登録商標）Ruby protein gel stainによる染色後のゲル（D）である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

本発明の最大の特徴は、標識基を有する一般式（I）で示される金属錯体化合物又は一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物を特異的にリン酸基を有する物質と結合させ複合体を形成させることによって、リン酸基を有する物質を容易に特定できることにある。即ち、従来、リン酸基を有する物質と結合できる金属錯体は種々知られていたものの、一般式（I）で示される金属錯体化合物又は一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物に類似の化合物で且つ標識基を有するものはなかったところ、本発明者らは、一般式（I）で示される金属錯体化合物又は一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物を用いれば、複数の物質が含まれている試料中でも、極めて容易にリン酸基を有する物質を検出し特定できることを見出し、本発明を完成したものである。

【0037】

一般式（I）で示される金属錯体化合物、一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物及び一般式（III）で示される金属錯体化合物について説明する。

【0038】

「2価の陽イオンに成り得る金属原子」とは、2価の正の電荷をもつイオンに成り得る典型元素又は遷移元素の金属原子である。このような2価の陽イオンに成り得る金属原子としては、例えば、ベリリウム、マグネシウム、カルシウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ゲルマニウム、ストロンチウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、スズ、バリウム、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、水銀、鉛、ポロニウム、ラジウム等を挙げることができ、当該錯体化合物のリン酸基を有する物質に対する配位結合能が大きいので、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛が好ましく、マンガン、鉄、亜鉛がより好ましい。

【0039】

「炭素数が1～16であるアルキル基」とは、炭素数が1～16である直鎖又は分岐鎖のアルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、イソプロピル基、t-ブチル基等を挙げることができ、炭素数が1～4である直鎖又は分岐鎖のアルキル基が好ましく、炭素数1～2であるアルキル基がより好ましい。

【0040】

「アシル基、アルコキシカルボニル基、アシルアルキル基、アルコキシカルボニルアル

キル基、カルボシキアルキル基、カルバモイルアルキル基、シアノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基又はハロアルキル基」中のアルキル部分は上記と同義である。

【0041】

「結合基」とは、当該錯体化合物中、主骨格と標識基とを結合する任意の基であり、当該錯体化合物の製造を容易にしたり、また、当該錯体化合物とリン酸基を有する物質中のリン酸基との配位を標識基が阻害しないようにする作用を有する。従って、当該錯体化合物の製造において、標識基が主骨格に直結した原料化合物の入手が容易であったり、標識基が比較的小さくリン酸基への配位が阻害されない場合には、結合基は、主骨格と標識基を直結する単なる共有結合であってもよい。結合基としては、前述した作用を有するものであれば特に限定されないが、例えば、C1-C6アルキレン基、アミノ基(-NH-)、エーテル基(-O-)、チオエーテル基(-S-)、カルボニル基(-C(=O)-)、チオニル基(-C(=S)-)、エステル基、アミド基、ウレア基(-NHC(=O)NH-)、チオウレア基(-NHC(=S)NH-)；アミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基からなる群より選択される基を一端に有するC1-C6アルキレン基；アミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基からなる群より選択される同一又は異なった基を両端に有するC1-C6アルキレン基；及びアミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基及びC1-C6アルキレン基からなる群より選択される2以上、好ましくは2~12、特に好ましくは、2~6の基が直線状に結合された基を挙げることができる。ここで、C1-C6アルキレン基とは、炭素数1~6の直鎖状又は分枝鎖状の2価脂肪族炭化水素基をいい、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、テトラメチレン、ヘキサメチレン、エチルメチレン、メチルプロピレン、ジメチルプロピレン等を挙げることができ、C1-C4アルキレン基が好ましく、C1-C2アルキレン基がより好ましい。

【0042】

「標識基」とは、免疫染色法及びそれと類似する染色法に使用されるものであれば特に制限はないが、取り扱い性の面から放射性同位体元素を含むものは好ましくない。このような標識基としては、例えば、酵素、蛍光発色基、ビオチン、金コロイド等を挙げることができる。標識基は、結合基を介して当該錯体化合物中に導入するが、その方法は、当業者にとって公知である。

【0043】

酵素は、触媒活性を有するタンパク質であるが、生化学の分野で標識酵素として一般に使用されているものを特に制限なく用いることができる。このような酵素としては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ等を挙げることができる。そして、各酵素に応じた発色試薬又は発色試薬と基質を作用させれば、酵素により標識されたリン酸基を有する物質を染色し、検出することができる。このような酵素に対する発色試薬又は発色試薬と基質の組合せとしては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にはECL(商標)、Super Signal(登録商標)、ジアミノベンジジン(DAB)と過酸化水素等、アルカリホスファターゼにはCDP-Star(商標)、CSPD(登録商標)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)と5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸、Attophos(商標)等、ルシフェラーゼにはルシフェリン等を挙げることができる。

【0044】

蛍光発色基は、比較的長波長の蛍光を安定的に発色し得る置換基をいい、水溶性、脂溶性を問わず、生化学分野で一般的に使用されているものを特に制限なく用いることができる。このような蛍光発色基としては、例えば、アミノメチルクマリン及びその誘導体、フルオレセイン及びその誘導体、テトラメチルローダミン及びその誘導体、アントラニロイル及びその誘導体、ニトロベンゾキサジアゾール及びその誘導体、ジメチルアミノナフタ

10

20

30

40

50

レン及びその誘導体等を挙げることができる。

【0045】

ビオチンは、卵白由来のアビジンと放線菌由来のストレプトアビジンに対して、特異的で且つ強い親和性を有している。従って、標識基としてビオチンを有する当該錯体化合物に、アビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体を結合させ、更にビオチン化した酵素を作用させれば、又はアビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体が結合した酵素を作用させれば、ビオチン及びアビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体等を介して、本発明の錯体化合物と酵素を特異的に結合させることができる。そして、当該酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ等を用い、各酵素に応じた発色試薬を作用させれば、リン酸基を有する物質を特定することができる。例えば、リン酸基を有する物質に標識基としてビオチンを有する当該錯体化合物を結合させ、当該錯体化合物にストレプトアビジンを介し酵素としてアルカリホスファターゼを結合させ、発色試薬としてニトロブルーテトラゾリウムと5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて数時間反応させると、リン酸基を有する物質は紫色に発色するので、これにより特定される。また、ローダミン等の蛍光発色基で標識されたストレプトアビジンも市販されており、これを使用すれば、通常の蛍光画像解析法でリン酸基を有する物質を特定できる。

10

【0046】

金コロイドは、金原子凝集体が液相等に分散したもので、走査型電子顕微鏡又は透過型電子顕微鏡で直接観察できる。従って、金コロイドで標識されたリン酸基を有する物質は、電子顕微鏡でその局在を観察することができる。また、銀試薬を用いた増感法により、転写した膜や光学顕微鏡での免疫組織染色にも利用できる。

20

【0047】

リン酸基を有する物質の染色方法について説明する。

【0048】

「リン酸基を有する物質」とは、2価のリン酸モノエステルアニオン ($-OPO_3^{2-}$) を有する物質、つまり、リン酸モノエステル基を有する物質である。このようなリン酸基を有する物質としては、例えば、リン酸化されたアミノ酸、リン酸化されたアミノ酸残基、リン酸化されたアミノ酸残基を有するタンパク質 (リン酸化タンパク質)、リン酸化されたアミノ酸残基を有するポリペプチド (リン酸化ポリペプチド)、リン酸化されたアミノ酸残基を有するオリゴペプチド (リン酸化オリゴペプチド)、リン酸化されたアミノ酸残基を有するペプチド (リン酸化ペプチド)、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、リン脂質、リン酸化された糖類等を挙げることができる。

30

【0049】

「染色方法」とは、主に免疫染色法及びそれと類似する染色法のことである。免疫染色法とは、ある特定の分子に対する特異的な抗体を利用して抗原抗体反応を行うことにより、その特定の分子を検出する方法である。検出方法を大別すると直接法と間接法に分けられ、更に、間接法には酵素抗体法、蛍光抗体法、ABC (アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体) 法、金コロイド法等が挙げられる。また、染色する試料としては、例えば、細胞又は電気泳動後のセルロースアセテート膜、ポリアクリルアミドゲル若しくはアガロースゲル等、或いはウェスタンブロット法、サザンブロット法若しくはノーザンブロット法等のプロット法により転写したニトロセルロース膜、ナイロン膜又はポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜等の膜等を挙げることができる。

40

【0050】

一般式 (I) で示される金属錯体化合物又は一般式 (II) で示される亜鉛錯体化合物は、溶媒に溶解した溶液としても用いることができる。使用できる溶媒は、リン酸基を有する物質の検出を阻害しないものであれば特に制限されないが、例えば、水 (緩衝液やその他の塩溶液を含む) ; メタノール、エタノール等のアルコール; これらの混合溶媒を挙げることができ、水 (緩衝液やその他の塩溶液を含む) とメタノール又は水 (緩衝液やその他の塩溶液を含む) とエタノール等の水系混合溶媒が好ましい。

50

【0051】

以下に、本発明に係るリン酸基を有する物質の染色方法を例示する。

【0052】

まず、リン酸化タンパク質の染色方法を例示する。対象となる細胞組織から、その細胞を構成する実質的に全てのタンパク質を含む試料を調整する。この調整は、生化学分野で一般的に用いられている方法により行うことができる。次に、当該試料に含まれるタンパク質を分離する。この分離方法は特に制限なく一般的なものを使用できるが、例えば電気泳動を用いればよい。電気泳動を使用する場合、泳動後のゲル又は泳動後のゲルをウェスタンブロット法により転写した膜等を一般式（I）で示される金属錯体化合物又は一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物の溶液に浸漬してリン酸化タンパク質を標識し、標識基の種類に応じた染色方法を用いて、リン酸化タンパク質を特定することができる。

10

【0053】

次に、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）の染色方法を例示する。サザンブロット法又はノーザンブロット法により転写した膜等において、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）断片上の特定の塩基配列に相補的なデオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）の末端リン酸基（リン酸モノエステル基）に一般式（I）で示される金属錯体化合物又は一般式（II）で示される亜鉛錯体化合物を結合させて標識し、それをデオキシリボ核酸（DNA）プローブ又はリボ核酸（RNA）プローブとすることができる。次に、当該デオキシリボ核酸（DNA）プローブ又はリボ核酸（RNA）プローブを利用して、サザンハイブリダイゼーション又はノーザンハイブリダイゼーションを行い、標識基の種類に応じた染色方法を用いて、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）を特定することができる。

20

【0054】

リン酸化アミノ酸残基の識別方法について説明する。

【0055】

「識別方法」とは、リン酸化タンパク質又はリン酸化ペプチド中のリン酸化アミノ酸残基を識別する方法のことであり、本発明に係るリン酸基を有する物質の染色方法と一般によく利用されている抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を組み合わせることで、リン酸化タンパク質又は非リン酸化タンパク質の区別のみならず、そのリン酸化タンパク質のリン酸化アミノ酸残基までを識別することが可能となる。

30

【0056】

本発明の識別方法で用いる抗リン酸化アミノ酸抗体としては、例えば、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化トレオニン抗体又は抗リン酸化チロシン抗体等を挙げることができる。

【0057】

識別方法は、例えば、先ず、本発明に係るリン酸基を有する物質の染色方法により、試料中の全てのタンパク質の中からリン酸化タンパク質のみを標識して検出する。次いで、ある特定のリン酸化アミノ酸に対する抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる免疫染色法を行い、当該染色方法の検出結果と比較することにより、ある特定のリン酸化アミノ酸残基を有するリン酸化タンパク質であるか、それ以外のリン酸化アミノ酸残基を有するリン酸化タンパク質であるかを識別することができる。

40

【0058】

本発明における金属錯体化合物は、適当な溶媒に溶解した溶液の形態で、リン酸基を有する物質の染色剤又は染色助剤として使用することができる。使用できる溶媒は、リン酸基を有する物質の検出を阻害しないものであれば特に制限されないが、例えば、水（緩衝液やその他の塩溶液を含む）；メタノール、エタノール等のアルコール；これらの混合溶媒を挙げることができ、水（緩衝液やその他の塩溶液を含む）とメタノール又は水（緩衝液やその他の塩溶液を含む）とエタノール等の水系混合溶媒が好ましい。

【0059】

本発明において標識基が酵素である金属錯体化合物は、酵素に応じた発色試薬との組合

50

せで、又は酵素に応じた発色試薬及び基質との組合せで、リン酸基を有する物質の染色用キットとして使用できる。このような酵素に対する発色試薬又は発色試薬と基質の組合せとしては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) には ECL (商標)、Super Signal (登録商標)、ジアミノベンジジン (DAB) と過酸化水素等、アルカリホスファターゼには CDP-Star (商標)、CSPD (登録商標)、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) と 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸、AttoPhos (商標) 等、ルシフェラーゼにはルシフェリン等を挙げることができる。また、本発明において標識基がビオチンである金属錯体化合物は、アビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体が結合した酵素及び酵素に応じた発色試薬との組合せで、又はアビジン若しくはストレプトアビジン又は抗ビオチン抗体が結合した酵素、酵素に応じた発色試薬及び基質との組合せで、リン酸基を有する物質の染色用キットとして使用できる。

10

【実施例】

【0060】

以下に、実施例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0061】

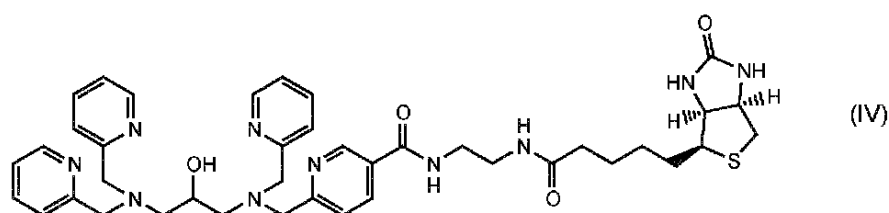
実施例 1

(亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液の調製)

20

式 (IV) :

【0062】



(IV)

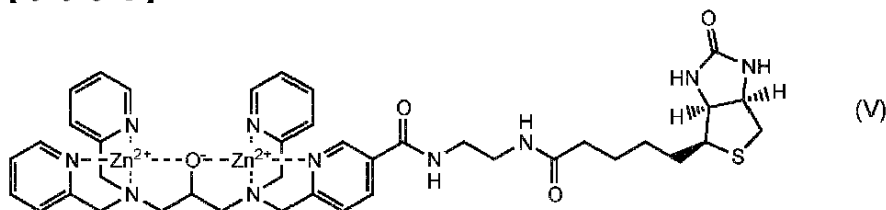
【0063】

30

で示される N, N, N'-トリス(2-ピリジルメチル)-N'-[(2-D-ビオチンアミドエチル)カルバモイル-2-ピリジルメチル]-1,3-ジアミノ-2-プロパノールを 10 mM と 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% (w/v) Tween 20 を 10% (v/v) メタノール水溶液で調整し、配位子溶液とする。100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 M 塩化ナトリウム及び 1% (w/v) Tween 20 を水で調整し、TBS-T (10×) とする。10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% (w/v) Tween 20 を水で調整し、TBS-T (1×) とする。配位子溶液 5 μL、TBS-T (10×) 50 μL、10 mM 硝酸亜鉛水溶液 5 μL、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン 1 μL 及び水 394 μL を混ぜて限外ろ過 (30 kD a) し、残渣を TBS-T (1×) 30 mL で溶解して、式 (V) :

40

【0064】



(V)

【0065】

50

で示される亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液とする。

【0066】

実施例2

(リン酸化タンパク質の染色方法1)

先ず、以下の条件で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用ゲル、泳動槽用緩衝液及びサンプル調整液を調整した。

濃縮ゲル溶液

4.5% (w/v) ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=30:1) 10

125mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8)

0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

分離ゲル溶液

12.5% (w/v) ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=30:1)

375mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.8)

0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

泳動槽用緩衝液

25mM トリス

192mM グリシン 20

0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

サンプル調整液

195mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8)

9% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

24% (w/v) グリセロール

15% (v/v) 2-メルカプトエタノール

0.1% (w/v) プロモフェノールブルー (BPB)。

【0067】

次に、レーン1:分子量マーカー (トリプシンインヒビター、炭酸デヒドラターゼ、卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ホスホリラーゼb)、レーン2: α -カゼイン、レーン3:脱リン酸化 α -カゼイン、レーン4: β -カゼイン、レーン5:脱リン酸化 β -カゼインをサンプル調整液に溶解して試料とし、これを調整したSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用ゲルにプロットした後、プロモフェノールブルー (BPB) がゲル下端に到達するまで40mAの定電流電気泳動を行った。 30

【0068】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったゲルを固定液に約15分間浸漬し、続いて、SYPRO (登録商標) Ruby protein gel stain に約3時間浸漬した後、溶液から取り出して脱色液で2時間洗浄して、UVトランスイルミネーターで視覚化した。 40

【0069】

また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったゲル上のタンパク質を、セミドライ式ブロッティングにより、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転写させた。転写したポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜を実施例1で調製した亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液に約30分間浸漬した後、溶液から取り出して10分間洗浄して、発色試薬としてECL (商標) Plusを用いて、化学発光画像解析装置で視覚化した。

【0070】

本発明に係る亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜をA、SYPRO (登録商標) Ruby protein gel stain による染色後のゲル 50

ルをBとして図1に示す。

【0071】

図1の通り、本発明の方法によれば、リン酸基を有する α -カゼイン及び β -カゼインのみが特定できる。従って、本発明の方法によれば、生体試料からリン酸化タンパク質のみを特定し得ることが明らかとなった。

【0072】

実施例3

(リン酸化タンパク質の染色方法2)

先ず、上記実験例2と同様の条件で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用ゲル、泳動槽用緩衝液及びサンプル調整液を調整した。

10

【0073】

次に、レーン1：分子量マーカー(トリプシンインヒビター、炭酸デヒドラターゼ、卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ホスホリラーゼb)、レーン2：卵白アルブミン、レーン3：脱リン酸化卵白アルブミン、レーン4：ペプシン、レーン5：脱リン酸化ペプシンをサンプル調整液に溶解して試料とし、これを調整したSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用ゲルにプロットした後、プロモフェノールブルー(BPB)がゲル下端に到達するまで40mAの定電流電気泳動を行った。

【0074】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ったゲルを固定液に約15分間浸漬し、続いて、SYPRO(登録商標)Ruby protein gel stainに約3時間浸漬した後、溶液から取り出して脱色液で2時間洗浄して、UVトランスイルミネーターで視覚化した。

20

【0075】

また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ったゲル上のタンパク質を、セミドライ式プロットイングにより、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に転写させた。転写したポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜を実施例1で調製した亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ストレプトアビジン複合体溶液に約30分間浸漬した後、溶液から取り出して10分間洗浄して、発色試薬としてECL(商標)Plusを用いて、化学発光画像解析装置で視覚化した。

30

【0076】

本発明に係る亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜をA、SYPRO(登録商標)Ruby protein gel stainによる染色後のゲルをBとして図2に示す。

【0077】

図2の通り、本発明の方法によれば、リン酸基を有する卵白アルブミン及びペプシンのみが特定できる。従って、本発明の方法によれば、生体試料からリン酸化タンパク質のみを特定し得ることが明らかとなった。

【0078】

実施例4

(リン酸化アミノ酸残基の識別方法)

先ず、上記実験例2と同様の条件で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用ゲル、泳動槽用緩衝液及びサンプル調整液を調整した。

40

【0079】

次に、レーン1：A-431全細胞抽出液、レーン2：上皮増殖因子(EGF)刺激A-431全細胞抽出液、レーン3：アルカリホスファターゼで処理した上皮増殖因子(EGF)刺激A-431全細胞抽出液をサンプル調整液に溶解して試料とし、これを調整したSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用ゲルにプロットした後、プロモフェノールブルー(BPB)がゲル下端に到達するまで40mAの定電流電気泳動を行った。

50

【0080】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったゲルを固定液に約15分間浸漬し、続いて、SYPRO (登録商標) Ruby protein gel stain に約3時間浸漬した後、溶液から取り出して脱色液で2時間洗浄して、UVトランスイルミネーターで視覚化した。

【0081】

また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったゲル上のタンパク質を、セミドライ式ブロットイングにより、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転写させた。転写したポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜を実施例1で調製した亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液に約30分間浸漬した後、溶液から取り出して10分間洗浄して、発色試薬としてECL (商標) Plusを用いて、化学発光画像解析装置で視覚化した。

10

【0082】

また、転写したポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜を1%ウシ血清アルブミン TBS-T (1×) 溶液に約1時間浸漬した後、溶液から取り出して20分間洗浄して、次に、0.1%西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗リン酸化チロシン抗体 TBS-T (1×) 溶液に約1時間浸漬した後、溶液から取り出して20分間洗浄して、発色試薬としてECL (商標) Plusを用いて、化学発光画像解析装置で視覚化した。

【0083】

また、転写したポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜を1%ウシ血清アルブミン TBS-T (1×) 溶液に約1時間浸漬した後、溶液から取り出して20分間洗浄して、次に、0.1%ウサギ抗リン酸化セリン抗体 TBS-T (1×) 溶液に約1時間浸漬した後、溶液から取り出して20分間洗浄して、次に、0.008%西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ免疫グロブリン G (IgG) 抗体 TBS-T (1×) 溶液に約1時間浸漬した後、溶液から取り出して20分間洗浄して、発色試薬としてECL (商標) Plusを用いて、化学発光画像解析装置で視覚化した。

20

【0084】

本発明に係る亜鉛錯体化合物-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン複合体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜をA、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗リン酸化チロシン抗体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜をB、ウサギ抗リン酸化セリン抗体溶液及び西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ免疫グロブリン G (IgG) 抗体溶液による染色後のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜をC、SYPRO (登録商標) Ruby protein gel stain による染色後のゲルをDとして図3に示す。

30

【0085】

図3の通り、本発明の方法によれば、A-431全細胞抽出液、上皮増殖因子 (EGF) 刺激A-431全細胞抽出液及びアルカリホスファターゼで処理した上皮増殖因子 (EGF) 刺激A-431全細胞抽出液中のリン酸化タンパク質並びにリン酸化チロシン残基を有するリン酸化タンパク質、リン酸化セリン残基を有するリン酸化タンパク質及びそれ以外のリン酸化アミノ酸残基を有するリン酸化タンパク質の特定が可能となった。従って、本発明の方法によれば、生体試料からリン酸化タンパク質及びリン酸化アミノ酸残基を特定し得ることが明らかとなった。

40

【産業上の利用可能性】

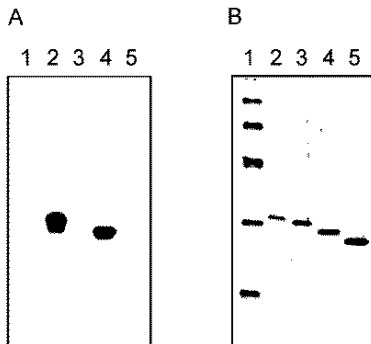
【0086】

本発明に係るリン酸基を有する物質の染色剤及び染色方法は、リン酸基を有する物質を容易に検出することができる。従って、生体試料等に本発明を適用することによって、病気の診断等に 응용でき得る点で非常に有用である。また、本発明に係るリン酸基を有する物質の染色方法と抗リン酸化アミノ酸抗体を組み合わせることで、リン酸化アミノ酸残基を簡便に識別することができる。また、本発明に係る化合物は、リン酸基を有する物質に

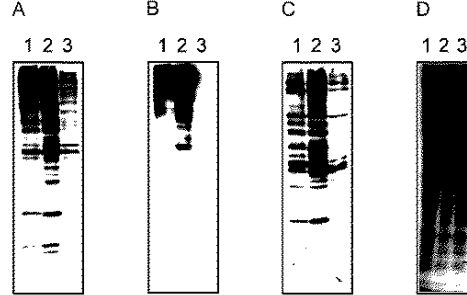
50

対して従来にない配位結合を示すことから、上記方法で使用できる化合物として有用である。

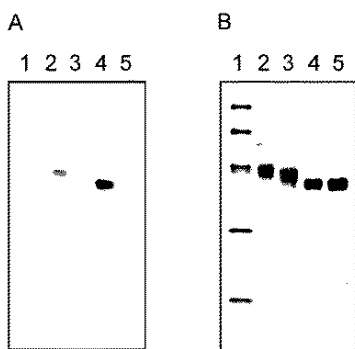
【図 1】



【図 3】



【図 2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/315705
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C09B57/10(2006.01)i, C07D495/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/532(2006.01)i, C07F3/06(2006.01)n, C12Q1/28(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C09B57/10, C07D495/04, G01N33/53, G01N33/532, C07F3/06, C12Q1/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004/078724 A1 (Kabushiki Kaisha Nard Kenkyusho), 16 September, 2004 (16.09.04), Claims; page 9, lines 4 to 17; examples & EP 1455189 A1 & US 2004/198712 A1	1-3, 9-11 4-8
Y	JP 2005-69788 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 17 March, 2005 (17.03.05), Claims (Family: none)	4-6
Y	YAMAGUCHI, K. et al., 'Hydrolysis of phosphodiester with hydroxo- or carboxylate-bridged dinuclear Ni(II) and Cu(II) complexes', Chem. Commun., 2001, No.4, p.375-376	7, 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September, 2006 (19.09.06)		Date of mailing of the international search report 03 October, 2006 (03.10.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/038442 A1 (Kabushiki Kaisha Nard Kenkyusho), 28 April, 2005 (28.04.05), & US 2005/38258 A1	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 5 7 0 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C09B57/10(2006.01)i, C07D495/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/532(2006.01)i, C07F3/06(2006.01)n, C12Q1/28(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C09B57/10, C07D495/04, G01N33/53, G01N33/532, C07F3/06, C12Q1/28											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus(STN), REGISTRY(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X Y	WO 2004/078724 A1 (株式会社ナード研究所) 2004.09.16, 請求の範囲, 第9頁第4-17行, 実施例 & EP 1455189 A1 & US 2004/198712 A1	1-3, 9-11 4-8									
Y	JP 2005-69788 A (住友ベークライト株式会社) 2005.03.17, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	4-6									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 19.09.2006		国際調査報告の発送日 03.10.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松本 直子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 9546								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 5 7 0 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAGUCHI, K. et al., 'Hydrolysis of phosphodiester with hydroxo- or carboxylate-bridged dinuclear Ni(II) and Cu(II) complexes', Chem. Commun., 2001, No.4, p.375-376	7, 8
A	WO 2005/038442 A1 (株式会社ナード研究所) 2005.04.28 & US 2005/38258 A1	1-11

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 P

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 木下 恵美子

広島県広島市東区牛田本町5丁目4-1-404

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB03 FB13 GC15

4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 DD06 EE13 FF04 GG06 HH08 JJ05

LL04

4H048 AA01 AA03 AB80 VA20 VA32 VA42 VA66 VB10

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	染色具有磷酸基团的物质的方法		
公开(公告)号	JPWO2007018225A1	公开(公告)日	2009-02-19
申请号	JP2007529601	申请日	2006-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	玛奈克股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	マナック株式会社		
[标]发明人	小池透 木下英司 木下惠美子		
发明人	小池透 木下英司 木下惠美子		
IPC分类号	G01N33/58 C07F3/06 C07D495/04 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/50		
CPC分类号	C07D495/04 C09B57/10 G01N33/58 G01N33/6842 Y10T436/25		
FI分类号	G01N33/58.Z C07F3/06.CSP C07D495/04.103 G01N33/53.U G01N33/68 G01N33/50.P		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB13 2G045/GC15 4C071/AA01 4C071/BB01 4C071/CC02 4C071/CC21 4C071/DD06 4C071/EE13 4C071/FF04 4C071/GG06 4C071/HH08 4C071/JJ05 4C071/LL04 4H048/AA01 4H048/AA03 4H048/AB80 4H048/VA20 4H048/VA32 4H048/VA42 4H048/VA66 4H048/VB10		
代理人(译)	津国肇 田畑幸四郎		
优先权	2005230583 2005-08-09 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种能够容易地在生物样品等中检测具有磷酸根基团的化合物的方法，一种方便地鉴定磷酸化氨基酸残基的方法以及一种具有高能力的结果可用于该方法的化合物 提供了与具有磷酸基团的物质配位键。通式 (I) 表示的金属络合物：(式中，M表示能够成为支链的金属原子，R彼此可以相同或不同，并且可以表示氢原子；1~16的烷基。碳原子；酰基，烷氧基羰基，酰基烷基，烷氧基羰基烷基，羧烷基，氨基甲酰基烷基，氰基烷基，羟烷基，氨基烷基或卤代烷基(其中，其烷基部分(具有1至16个碳原子)；羧基；氨基甲酰基；氰基；羟基；氨基；或卤代基，X表示结合基团，Y表示标记基团)具有高的与具有磷酸根基团和具有标记基团的物质配位键的能力的结果是具有易于被识别的磷酸基团的基团。

一般式 (I) :

