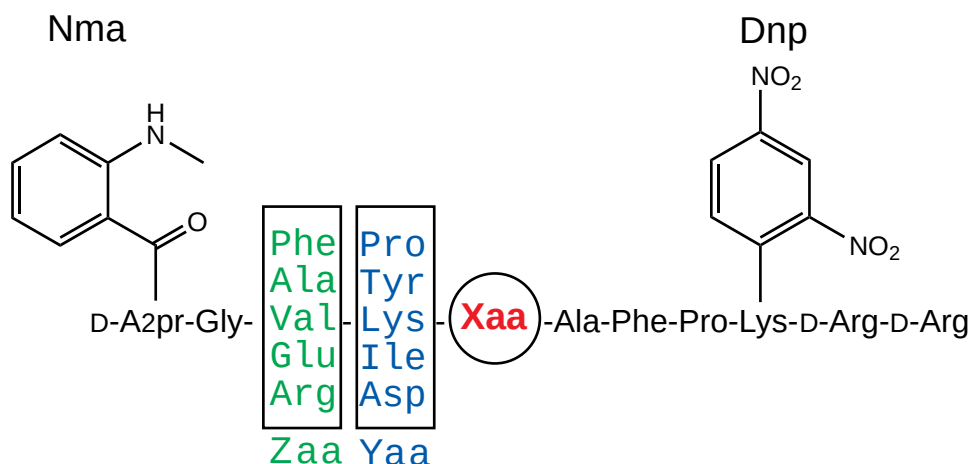


待望の消光性蛍光基質ライブラリー誕生

プロテアーゼの基質特異性を簡便、迅速に同定

FRETs-25Xaa Series



● ライブラリーの構造

FRETs-25Xaaシリーズ (#3701-v~#3719-v) は、蛍光基 (Nma) と消光基 (Dnp) を各々 D-A2pr と Lys の側鎖に有する Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) タイプの消光性蛍光基質です。

Xaaには、Cys以外の19種類の通常のアミノ酸を導入しています。また、**Yaa**と**Zaa**には、各々性質の異なる5種類のアミノ酸の混合物 (**Pro, Tyr, Lys, Ile, Asp**) と (**Phe, Ala, Val, Glu, Arg**) を導入しています。

このライブラリーのデザインにより、各 Xaa シリーズは $5 \times 5 = 25$ 種類の基質混合物となっています。また、ライブラリー全体としては、 $19 \times 25 = 475$ 種類の多種組み合わせを持った基質で構成されています。

● 酵素反応検出の原理

酵素により D-A2pr (Nma) と Lys (Dnp) の間の結合が切断されると、分子内の Dnp 基で消光されていた Nma 基の蛍光強度 ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) が増加します。酵素による切断の割合と蛍光強度の増加には正の相関が認められています。

● 測定方法の概略

▶ 一次スクリーニング

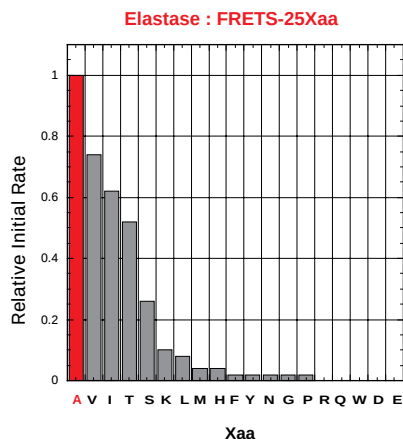
1. 19種類のXaaシリーズを各々目的のプロテアーゼと反応させる。
2. 酵素反応液の蛍光測定で最も速く水解されるXaaを特定する。

▶ 二次スクリーニング

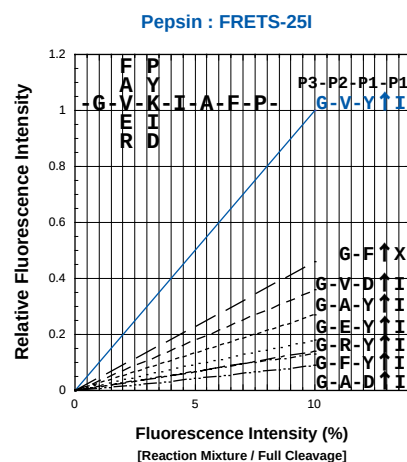
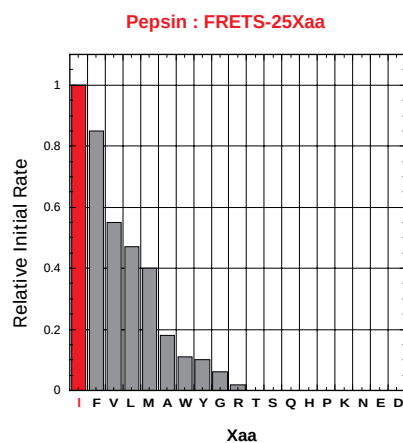
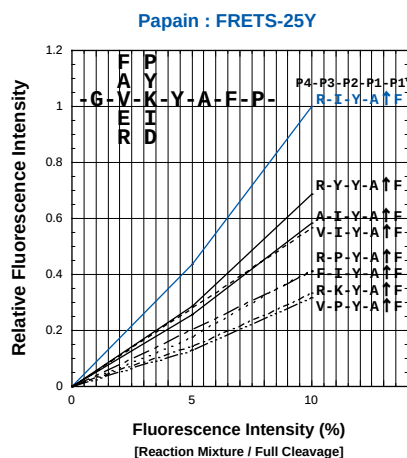
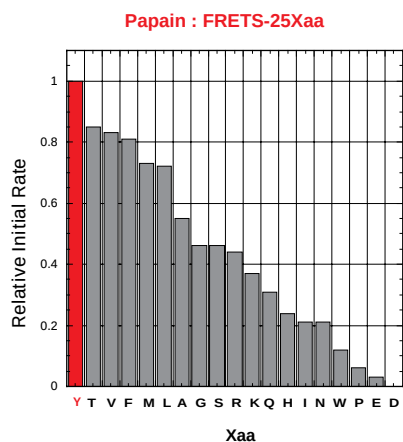
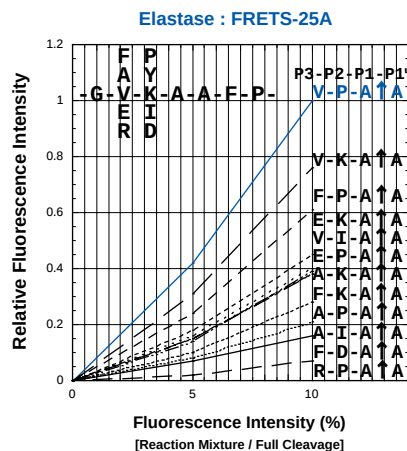
1. 最も速く水解されたXaaシリーズの水解断片をLC-MSで分析する。
2. 水解断片の分子量から水解された部位のアミノ酸配列を特定する。

● 実施例

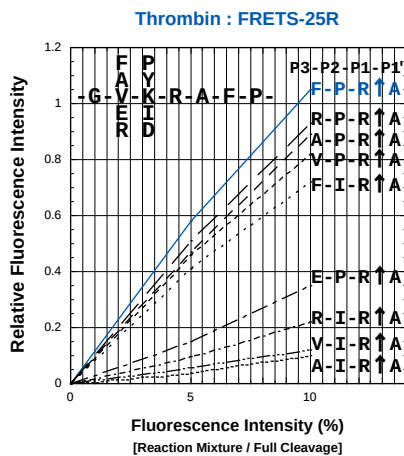
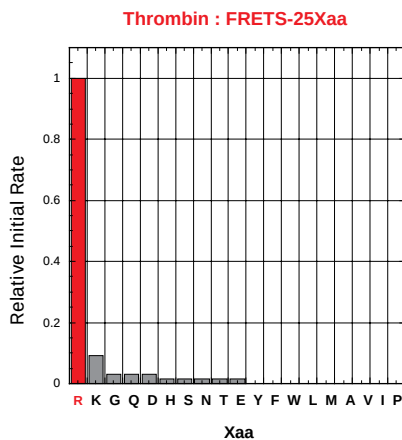
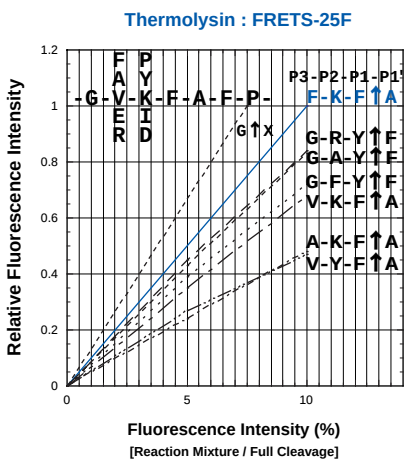
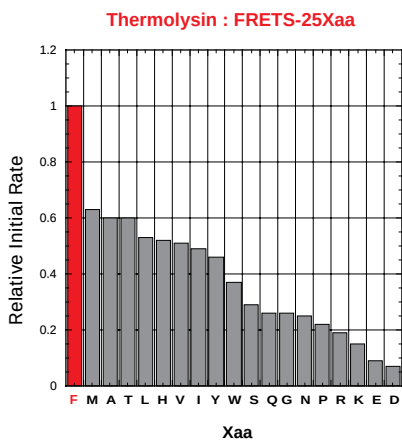
▣ 一次スクリーニングの結果



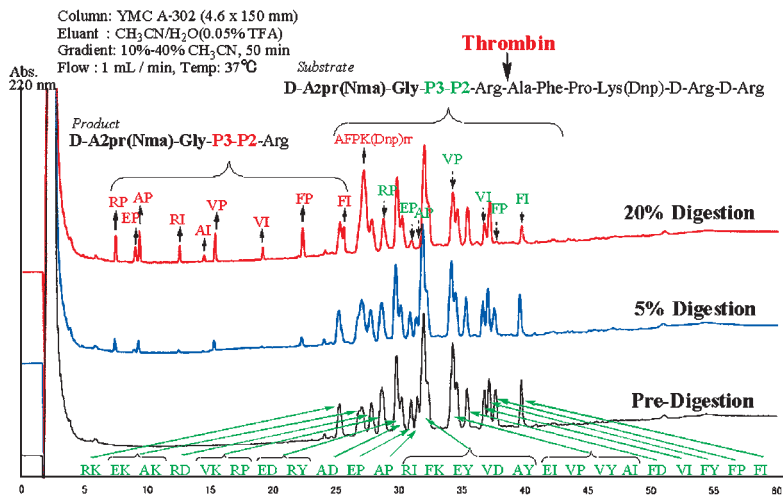
▣ 二次スクリーニングの結果



FRETS-25Xaa Series



■ Thrombinによる FRET-S-25Arg の水解パターン (二次スクリーニング)



FRETS-25Xaa Series

■ FRETS-25Xaa Series を用いて決定された基質特異性

Protease		Preferred Xaa	Identified Zaa - Yaa - Xaa
Serine protease	Thrombin	Arg	Phe - Pro - Arg ↑ Ala
	Elastase	Ala	Val - Pro - Ala ↑ Ala
	Trypsin	Arg	Val - Pro - Arg ↑ Ala
	Chymotrypsin	Tyr	Val - Pro - Tyr ↑ Ala
	Kex2	Arg	Arg - Lys - Arg ↑ Ala
Thiol protease	Papain	Tyr	Arg - Ile - Tyr - Ala ↑
Acid protease	Pepsin	Ile	Val - Tyr ↑ Ile - Ala
Metalloprotease	Thermolysin	Phe	Phe - Lys - Phe ↑ Ala

↑ 各Protease による切断部位

● 有効性と限界

上記の通り、FRETS-25Xaaの有効性は、Thrombin, Elastase, Trypsin, Papain, Pepsin, Thermolysinなど多くの酵素で確認しています。¹⁾ また、新たに発見された酵素の基質特異性をFRETS-25Xaaシリーズの基質ライブラリーを用いて迅速に同定した応用例についての論文が発表されました。²⁾

しかし、Caspase-3やFurinに対しては明確な水解活性は認められません。本ライブラリーは3残基 (Zaa-Yaa-Xaa) 部分を変化させているため、P4位など幅広い領域に強い特異性を示すCaspase-3やFurinなどの酵素では水解されない可能性があるかと評価できます。

1) K. Takada, M. Tsunemi, Y. Nishiuchi, and T. Kimura, A Fluorescence Resonance Energy Transfer Substrate (FRETS) Library for Determining Protease Specificity. *Peptide Revolution: Genomic, Proteomics & Therapeutics (Proceedings of the 18th American peptide symposium)* in press.

2) S. Tanskul, K. Oda, H. Oyama, N. Noparatnaraporn, M. Tsunemi, and K. Takada, Substrate specificity of alkaline serine proteinase isolated from photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus* KDD51. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 547 (2003)

● 価 格

1本 (1 μmol, total peptide cont.) / ¥10,000

※ご注文の際には、事前にご相談下さい。

カスタムサービス部

TEL.072-729-6105 FAX.072-729-4124

E-mail custom@peptide.co.jp



PEPTIDE INSTITUTE, INC.

4-1-2 Ina, MINOH-SHI, OSAKA 562-8686, JAPAN
Phone +81-(0)72-729-4121 Fax:+81-(0)72-729-4124
E-mail info@peptide.co.jp
http://www.peptide.co.jp/

株式会社 ペプチド研究所

〒562-8686 大阪府箕面市稲 4丁目1番2号
TEL.072-729-4121 FAX.072-729-4124
E-mail info@peptide.co.jp
http://www.peptide.co.jp/