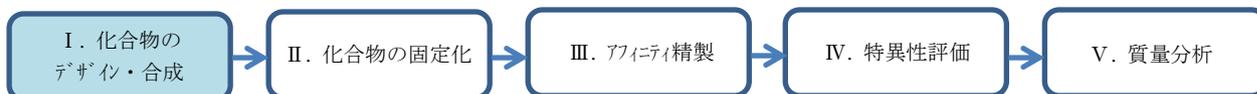


受託サービス詳細

【ケミカルプルダウン（ケミカルバイオロジー）】

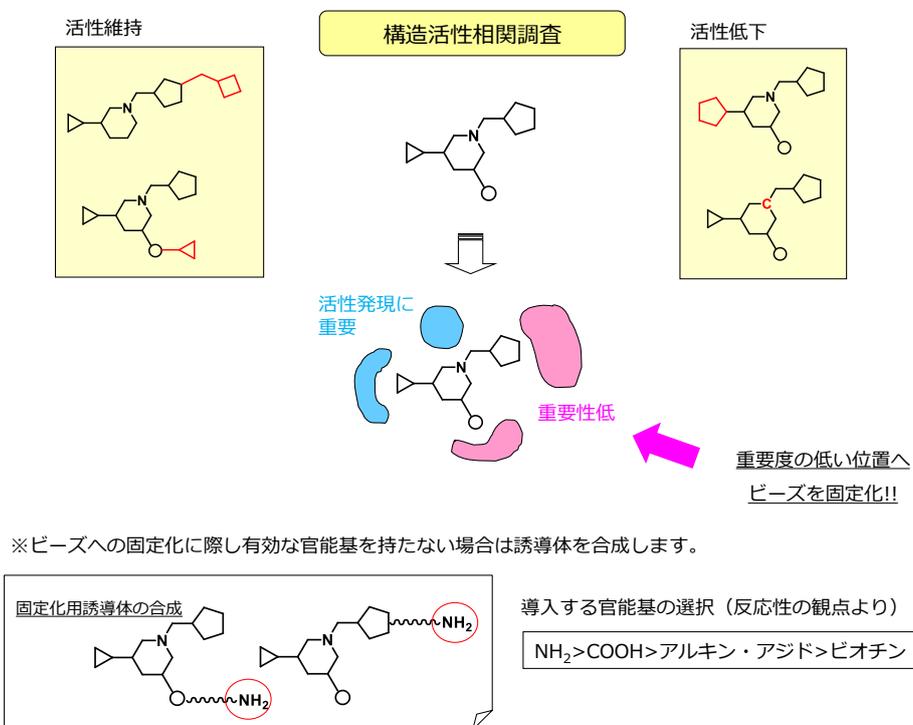
I.	化合物のデザイン・合成	・・・P1
II.	化合物の固定化	・・・P2
III.	結合タンパク質のアフィニティ精製	・・・P3
IV.	特異性評価（薬剤競合溶出、競合阻害実験）	・・・P4
V.	質量分析	・・・P5
VI.	費用の概算例	・・・P6



ケミカルプルダウン-I. 化合物のデザイン・合成

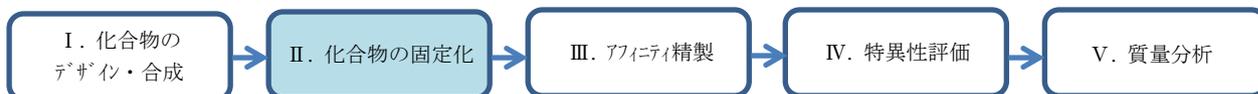
納期：2～6ヶ月

費用：50～200万円



同定までに必要な化合物量：2～50 mg

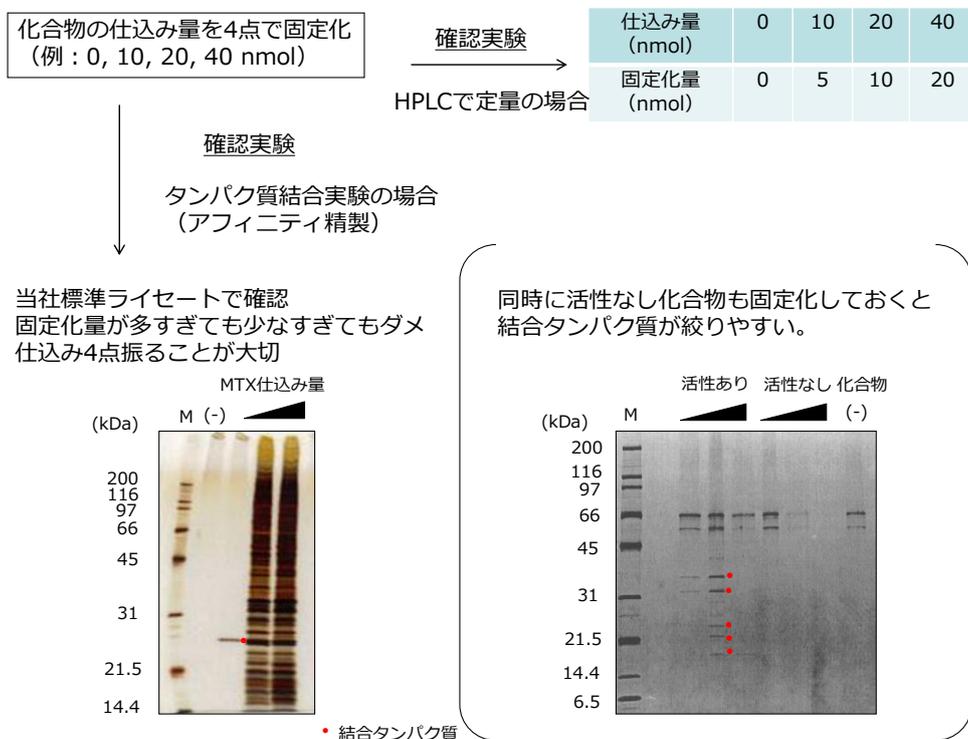
化合物をビーズへ固定化する際に注意すべきことは2つあります。1つ目は構造活性相関です。化合物上の標的タンパク質との結合部位で化合物をビーズ上に固定化してしまうと標的タンパク質が結合できなくなるため、化合物の活性に関係のない位置でビーズ上へ固定化する必要があります。構造活性相関が明確でない場合は、同じ活性を有する類似構造の化合物を複数種比較し、ファーマコア予測を行い、ビーズへの固定化部位を決定します。2つ目は、ビーズへの固定化に有効な官能基がその部位にあるかどうかです。もし無い場合は市販の誘導体を探します。市販で見つからない場合は合成して頂く必要があります。



ケミカルプルダウン-II. 化合物の固定化

納期：1～2ヶ月/回

費用：30～45万円/回



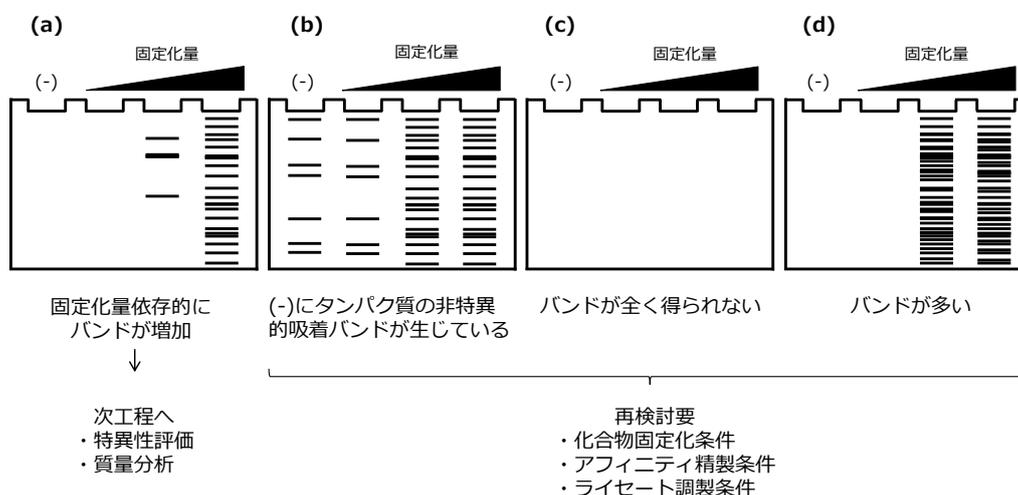
当社の標準プロトコールのように、化合物をビーズに固定化する場合、固定化量の最適化の検討を行うため、0 mM (化合物固定化なし) を含めて、化合物の仕込濃度を4点振ります。化合物は疎水的なものが多いので、あまり多くビーズ上に固定化するとビーズが疎水的な性質を持ってしまい、標的でない他のタンパク質が非特異的に吸着してバックグラウンドノイズとなってしまったり、化合物同士の立体障害でタンパク質が接近できず結合できなくなります。そのため、固定化濃度 (固定化量) を振り、最適な固定化量にアジャストする必要があります。また、この際、類似の化合物で活性の無い化合物も活性がある本化合物と同様にビーズに結合させておくと、活性有無の化合物固定化ビーズで精製されたタンパク質を比較することで標的タンパク質が絞りやすくなります。化合物の固定化の確認は、高速液体クロマトグラフィーによる定量または実際の細胞抽出液を使用したアフィニティ精製を行い判断します。細胞抽出液は当社で確認用のライセートを準備致しますが要望があれば実際の細胞抽出液でも並行してアフィニティ精製を実施することもできます。

関連実験プロトコール：003, 004, 005, 008, 014, 016, 108, 109, 111, 201



ケミカルプルダウン-III. 結合タンパク質のアフィニティ精製

納期：1～2ヶ月/回
費用：30万円~/回



化合物固定化ビーズと標的タンパク質含有細胞抽出液との結合実験（アフィニティ精製）を行い、結合タンパク質の SDS-PAGE バンドパターンを解析します。結合タンパク質が明確な場合 (a) は特異性評価（薬剤競合溶出、競合阻害実験）、質量分析と進みます。バンドが明瞭でない場合 (b～d) は、精製条件を振り直し再度検討を行います。アフィニティ精製条件検討だけでなく、場合によっては化合物の固定化からやり直します（化合物固定化量の最適化）。

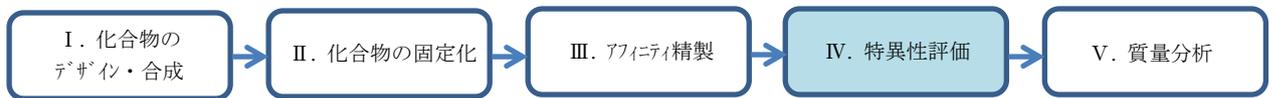
※ 細胞抽出液は下記の条件でご提供をお願いします。詳細は別途お打ち合わせさせていただきます。

タンパク質濃度：3 mg/ml 以上

タンパク質量：20 mg 程度

組成：結合タンパク質解析実験における結合・洗浄バッファと同じ組成
(20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂,
0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 0.2mM PMSF)

関連実験プロトコール：001

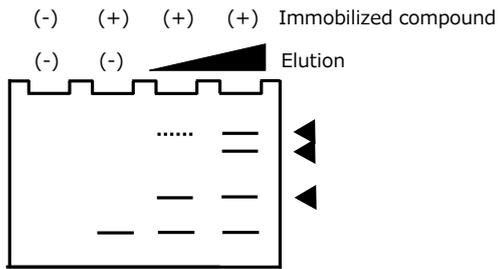


ケミカルプルダウン-IV. 特異性評価（薬剤競合溶出、競合阻害実験）

納期：1～2ヶ月/回

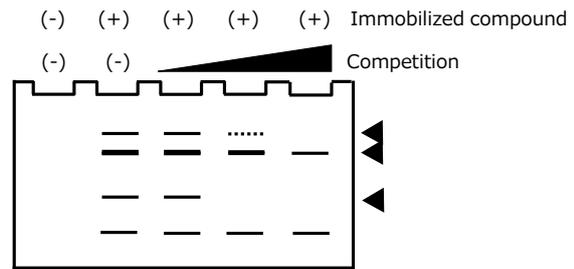
費用：30万円～/回

a. 薬剤競合溶出



薬剤添加量に依存して溶出されるバンドがあるか

b. 薬剤結合阻害実験



薬剤添加量に依存して薄くなるバンドまたは消失するバンドがあるか

バンドがある程度絞れたら、特異性が高いタンパク質かどうかを検討するために、ビーズに固定化していないフリーの化合物を用いた薬剤競合溶出（ドラッグエリユーション）または競合阻害実験を行います。ここで競合化合物による影響が確認できれば結合タンパク質である可能性は非常に高いです。

関連実験プロトコール：012, 013



ケミカルプルダウン-V. 質量分析

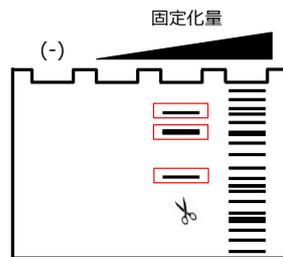
納期：2ヶ月～

費用：アフィニティ精製 30万円

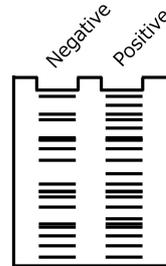
ゲル切り出し 35万円～/バンド

ショットガン 65万円～/サンプル

1. ゲル切り出し



2. ショットガン



ゲルに展開確認後、ビーズ上または溶出サンプルを酵素消化する

質量分析を行うためにアフィニティ精製を行い、サンプルを準備します。ゲル切り出しの場合は電気泳動後のゲル、ショットガンの場合はアフィニティ精製後のビーズを用意します。質量分析には、MS用の銀染色で確認できるバンドの10倍量（CBB染色で確認できる程度）のタンパク質量があることが望ましいです。質量分析にサンプル量が足りない場合はサンプル量を増やすために追加でアフィニティ精製を行います。また、化合物固定化ビーズを再度作製する場合があります。ゲル切り出しは、ゲル分離したタンパク質バンドを切り出し、プロテアーゼ処理して得られた断片ペプチドについて質量分析し、結合タンパク質を同定します。そのため、化合物特異的なバンドを数本に絞ることが必要です。ショットガン解析は、ゲル分離を介さないでビーズから溶出したすべての結合タンパク質をプロテアーゼ処理し（ビーズ上で酵素消化または溶出サンプルを全量酵素消化）、得られた断片ペプチドを網羅的に解析します。結合タンパク質が多い場合でも解析可能という利点がありますが目的の化合物に類似な化合物で活性が無いものなど比較対象が必要です。より正確な結果を得るためにはショットガン解析であつてもある程度までバンドを絞ることが重要です。

※ 質量分析は、当社から提携先の質量分析会社への委託となります。

〈質量分析サンプルの比較例〉

- **Positive** 化合物固定化ビーズと **Negative** 化合物固定化ビーズの精製サンプル
(例：活性がある化合物と、それと類似な構造で活性が無い化合物)
- 化合物固定化無しビーズ (0 mM) と化合物固定化ビーズの精製サンプル
- 薬剤競合溶出サンプル：化合物無し、化合物有り
- 競合阻害溶出サンプル：競合阻害無し、競合阻害有り

ケミカルプルダウン-VI. 費用の概算例（使用ビーズ代は別途必要）

【化合物のビーズへの固定化のみ】



II : NHS ビーズへのアミンを有する化合物の固定化 30 万円

【化合物の固定化から結合タンパク質の同定まで】



II : NHS ビーズへのアミンを有する化合物の固定化	30 万円
III : アフィニティ精製 (1 回目)	30 万円
III : アフィニティ精製 (2 回目)	30 万円
IV : 特性評価 (薬剤競合溶出)	30 万円
V : 質量分析	65 万円
合計	185 万円

※ 期間および費用は目安であり、化合物と結合タンパク質のアフィニティの強さ、結合タンパク質の存在量やアフィニティ精製後のゲルのバンドパターンにより大きく変わる可能性があります。

※ 各ステップ完了毎に結果をご報告させて頂き、次ステップの条件をお客様と確認しながら進めます。

※ 本資料の記載内容は予告なしに変更することがありますのでご了承ください。

多摩川精機株式会社 第三事業所製造部

〒395-8515 長野県飯田市大休 1879

E-mail : FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp