

HTSにおける薬剤標的としてのタンパク質キナーゼ



By Said Goueli, Ph.D.
Promega Corporation

人間のゲノムには推定2,000種類のキナーゼと500種類のホスファターゼが存在します。そして細胞中のタンパク質のほぼ1/3がリン酸化されます。ヒトゲノムならびに他のゲノム配列解読が終了することにより細胞成長の制御に関連するキナーゼとホスファターゼの更なる発見をもたらすかもしれません。これらの発見にともない、潜在的な遺伝子産物の同定や細胞中におけるこれら酵素とその機能を調べる新規の試薬や特異的なアッセイ法が必要となります。

はじめに

タンパク質リン酸化は増殖分化、分泌作用、アポトーシスなどの細胞のプロセスに関連します。タンパク質キナーゼやホスファターゼはこれらのプロセスを制御する主要な役割を果たし、様々なホルモンや、サイトカイン、神経伝達物質への細胞応答に影響を与えます。濃度や、細胞局在性、キナーゼとホスファターゼの活性の変化は標準的な細胞機能や細胞ホメオスタシスの維持において重要で(1,2)。例えば、非レセプタータンパク質チロシンキナーゼ(PTK)ZAP70の両コピーの不活性化は重症複合型免疫不全を引き起こします。加えて、XリンクBTK遺伝子の変異はガンマグロブリン血症をもたらします。その他の例には、次があげられます。i) XリンクRsk2タンパク質セリンキナーゼ遺伝子不活性化はCoffin-Lowry症候群の発症に関与している疑いがある、ii) aurora2タンパク質セリンキナーゼの過剰発現が結腸癌腫に関与している可能性がある、iii) MAPキナーゼの活性化は乳がん、結腸癌の病因である。インシュリン非依存性糖尿病ならびに周辺神経病も、レセプターPTKシグナリングが不十分であることにより引き起こされることが示されており、タンパク質リン酸化と脱リン酸化間の平衡が正常な細胞成長と機能の維持において重要である証拠となっています。

タンパク質キナーゼとキナーゼアッセイ

タンパク質キナーゼは新規薬物設計開発の主要な標的となるため、個別のキナーゼに特異的な酵素アッセイ法を開発する試みは可急の課題です(3)。インヒビターのケミカルライブラリーをスクリーニングし、治療薬の要件を満たすインヒビターを同定するためには、標的キナーゼに特異的な酵素アッセイ法を有することが不可欠です。数千数百万という化合物をスクリーニングするためには、アッセイは単に特異的であるだけでなく、ハイスループットレベルにまでスケールアップできることが必要となります。加えて、標的タンパク質キナーゼの探索のために発現ライブラリーをスクリーニングする場合、標的酵素の発現レベルが非常に低く、検出が困難である可能性があるため、アッセイは高感度でなければなりません。

プロメガは当初SignaTECT® Protein Kinase Assay Systems®において使用するためにSAM²® Biotin Capture Membrane(カタログ番号V2861, V7861)を開発しました(4,5)。このメンブレンはビオチン化基質を迅速かつ定量的に吸着させる高密度のストレプトアビジン有するよう独自の工程を経て調製されます。SignaTECT® Assayは[³²P]ATPでリン酸化される、キナーゼに特異的なビオチン化ペプチド基質と、同種のタンパク質キナーゼ(精製物、粗細胞あるいは組織抽出物)を使用しま

す。リン酸化したビオチン化ペプチドはSAM²® Membraneに捕らえられ、取りこまなかったRI標識ATPや他のリン酸化タンパク質は簡単な洗浄手順により除去されます。粗細胞抽出物中のキナーゼの正確な定量化に高い感度と選択性を提供するSAM²® Membraneを用いた方法は、リン酸化セルロース(P81)検出(6)のような従来のイオン交換ベースの方法と比べ大幅に改良されています。

SignaTECT® Kinase Assay System(7)の基本型は、より大きいメンブレンフォーマット(7.6 X 10.9センチ、カタログ番号V7861)とSAM²® 96 Biotin Capture Plate(96ウェル、カタログ番号7541, V7542)の開発でハイスループットフォーマットで使用できるようにスケールアップされました(8)。キナーゼアッセイを行なった後にサンプル(1-25µl)はマルチピペッターあるいは自動分注システムを用いて固相メンブレンあるいはプレートに移されます。メンブレン上に取り込まれた放射性標識物はPhosphorImager®分析あるいは従来のオートラジオグラフィ法によって定量化します。SAM²® 96 Biotin Capture Platesの場合にはMicroBeta® TriLux液体シンチレーションならびにルミネッセンスシステム(EG&G Wallac, Inc.)あるいはTopCount® マイクロプレートシンチレーションならびにルミネッセンスカウンター(Packard)によりRIを測定します。

表1. プロメガSAM²® 96 Biotin Capture Plate を用いて測定されたPKA 活性

サンプル	基質	PKA	基質 + PKA
A	12.0	40.2	26,438.5
B	30.1	36.2	24,518.1
C	24.1	22.1	22,017.8
D	28.1	18.1	23,666.7
E	20.4	10.2	25,403.9
F	22.4	32.6	24,695.9
G	18.3	42.8	24,051.2
H	16.3	40.7	26,886.9
Avg.	21.5	30.4	24,709.9
S.D.	6.02	12.09	1,559.11
%CV	28.06	39.81	6.31

酵素反応は基質のみ(基質)、酵素のみ(PKA)あるいは基質 + 酵素で行われました。反応は(6,7)で記述されるように停止し、サンプル(5µl)はSAM²® 96 Biotin Capture Plateのウェルに加えられました。ウェルはバキュームマニピュレーターを使って洗浄しました(2M NaClで4回洗浄、2M NaCl/1% HPO₄で6回洗浄、水で4回洗浄)。プレートを乾燥し、MicroBeta® TriLux液体シンチレーションカウンター(EG&G Wallac, Inc.)を用いて計測しました。A~H はサンプルの「ウェル間」変動を調べるためにランダムに置いたものを示します。結果はカウント分(cpm)で表わしました。Avg.=平均、S.D.=標準偏差、%CV=パーセント変動係数。

SAM²⁸ 96 Biotin Capture Plateの性能を示すためPKAアッセイを実施し、酵素のみ、基質のみ、そして両方ともある場合でKA活性を測定しました(表1)。酵素なし(「基質」)あるいは基質なし(「PKA」)で計測された放射活性は投入総カウント数の0.02%以下を示しました。バックグラウンドは非常に低く、アッセイは最大の時間効率があげられました(全洗浄手順が5分で終了)。酵素活性の変動係数は8%を超えず、高い再現性と一定したアッセイ性能を示していたことは注目に値します。

ピオチンとピオチン化ペプチドで試験した場合、図のようにSAM²⁸プレートの結合容量は1から500pmol/ウェルの間では直線性を示し、結合は化学量論的でした。この特徴は基質が高いKm値を持つPTKのような酵素において重要です。

SAM²⁸ Biotin Capture Membraneは多くの新しい特長を有しており、他のアッセイ系や市販されているアビジンコート96ウェルプレートより優れています。リン酸化されたピオチン化ペプチド基質とSAM²⁸メンブレン間の相互作用の特異性により、結合した放射性物質量は正確なリン酸化生成物量、すなわちサンプル内に存在する酵素量を表しています(図2)。リン酸化された内在性タンパク質はSAM²⁸ Membraneに吸着しません。[³²P]ATPや内在性基質のようなアッセイの妨げとなる成分の非特異的吸着が極めて低いため、バックグラウンドのカウントは非常に低く、サンプル中に低濃度で存在するキナーゼ酵素活性を測定するアッセイ系として選択すべきものとなっています。この非常に高い感度によりPKA、PKC、cdc2PK、PTK、DNA-PKならびにCaM KIIのような酵素を含むナノグラム量のサンプルからキナーゼ活性を測定することができます。(プロメガは酵素特異的な阻害分子をタンパク質ライブラリーよりスクリーニングする為の高純度に精製された酵素を用意しています。)

もう一つの長所として、SAM²⁸ Membraneは強く選択的な結合が可能であるため過酷な反応条件に耐えることができ(9)、リン酸化・ピオチン化ペプチドの損失を最小限に抑えます。この特長は*in vitro*で発現された酵素のアッセイと同様に、細胞ならびに組織中の酵素活性のアッセイにおいて重要です。他のタンパク質キナーゼとタンパク質基質の存在は酵素活性の正確な評価を行う上で難しい問題となり得るからです。加えて、アッセイは反応終了後10分以内に行うことができます(8)。

このアッセイ系の特筆すべき特長はSAM²⁸ Membraneへのピオチン化ペプチドの結合が基質のアミノ酸配列から独立しているということです。そのため、いくつかのペプチドやタンパク質基質を同時に定量することができ、信頼性のある動態特性の比較ができます。一方、静電的相互作用に基づくアッセイでは、結合は基質の配列に依存しています。このようなシステムの場合、特定の酵素に対する基質を複数用いると広範な酵素活性値が得られるため、研究上酵素の基質としての適性を評価することが困難になり(10)、結合したペプチド基質量の正確な評価は得ることができません。さらに、P81検出のようなイオン結合に基づいた方法では、マトリックスに結合させるためにペプチド基質のコンセンサス配列の変更が必要です。この変更によりその酵素に対する基質の特異性が変わり、他の酵素に対して良い基質であることを示す結果を得ることもあります。例えば、CDKキナーゼのペプチド基質にアルギニン残基を付加することによりPKAに対しても優れた基質にします(11)。

タンパク質キナーゼインヒビター

有機分子やペプチドインヒビターなどの化学的阻害物質は、タンパク質キナーゼを阻害する手段としてドミナントネガティブ変異酵素や、天然タンパク質インヒビターの過剰発現、温度感受性変異細胞株、キナーゼ選択的抗体のマイクロインジェクションの使用などと補完的に広く使われています(12,13)。PKAとPKCが代謝調節、炎症反応、異常な細胞増殖ならびにアポトーシスで重要な役割を担うという発見は、これら酵素の制御に関する研究強化のきっかけとなりました。これらの研究は最も効力がある天然キナーゼインヒビターの1つであるPKA、cAMP依存性タンパク質キナーゼペプチドインヒビター(PKI、カタログ番号V5681)の発見をもたらしました。類似の研究は酵素の疑基質領域に基づきKC

ペプチドインヒビターであるMyristoylated PKC Peptide Inhibitor(カタログ番号V5691)の発見を導きました。これらのインヒビターはそれぞれのキナーゼに対する選択性が高く、細胞透過性の有機分子インヒビターH7やH8を凌駕しています(14)。

標的となるタンパク質キナーゼに理想的な細胞透過性インヒビターの研究は、i) ハイスループットスクリーニングとコンビナトリアルケミストリー法を組合せた低分子ライブラリー生成分野の進歩、ii) 構造学的な手法を用いたりガンドデザインに活用できるリガンド タンパク質相互作用サイトの詳細な特性の解析能力、により加速しました。これら2つの技術の結びつきによりキナーゼベースの薬剤を数多く探しだすことができました(15)。このアプローチの有効性がいくつかの研究で示されています。例えば、ATP 結合サイトに対して薬剤を使用したり、近接したサイトの構造特性を研究することで、p38プロテインキナーゼに高い特異性を持ち、他のMAPキナーゼに対する効力の低いインヒビターの開発をもたらしました(16)。同様に、タンパク質キナーゼCDKファミリーの選択的なインヒビター olomoucineの構造的な特長を利用し、olomoucineを元の化合物としたケミカルライブラリーをスクリーニングすることによって、高感度で高い効力を持つインヒビターを作り出すことができました。その後の研究で作製された現在ヒトの臨床試験中であるCDK2-cyclin A(IC₅₀=6nM)に対するインヒビターは、最も効力のあるものの1つとして数えられています。

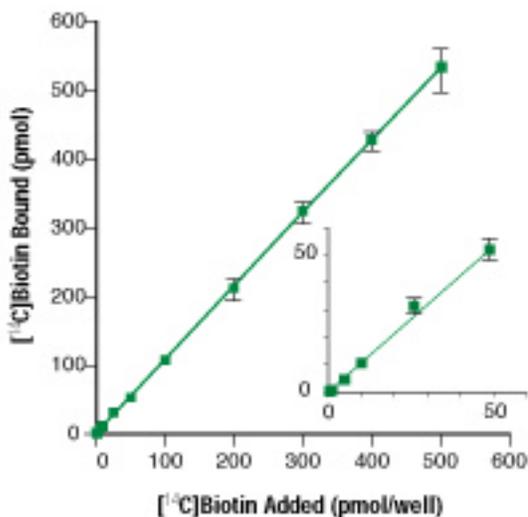


図1 . SAM²⁸ 96 Biotin Capture Plateへの「¹⁴C」ピオチン吸着の直線性
種々の濃度の¹⁴Cピオチンサンプル(5μl)はSAM²⁸ 96 Biotin Capture Plateの個々のウェルに加えられました。表1に記述するようにウェルを洗浄、乾燥、計測しました。挿入図はグラフの0~50pmolの部分の拡大図です。

腫瘍形成とアポトーシスにおけるMAPK経路の関連を示す膨大な数の研究により、ヒトの臨床試験に使用できるMAPKの理想的なインヒビターの発見に強い関心が集まっています(17-20)。ERK経路に目標を定めたインヒビター数種類の研究によって3つの新しいインヒビター、すなわちPD098059(21)、U0126(22)とPD184352(23)をもたらしました。私達はいくつかの細胞株ならびにいくつかのERK活性化条件におけるMEK1/2によるERK1/2の活性化を阻害するU0126の特異性を確認しました(24)。MEK Inhibitor U0126(カタログ番号V1121)はプロメガからご購入いただけます。

最近の研究では生体分子間認識が、多くの細胞外刺激に応答する細胞内シグナルの特異性に重要な役割を演じていることが示されています。選択されたグループのモチーフやモジュールを介するタンパク質 タンパク質相互作用が研究の焦点となりました(24)。

私達はPKAアンカータンパク質のPKA結合認識配列に対応する細胞透過性ペプチドモデルを用いてPKAアンカリングを介したシグナルの分断

に関心を持ちました(25)。プロメガはPKAアンカリングの働きを研究する上で有効な2つの試薬を導入しました。これらの試薬は細胞内PKAアンカリングに依存するいくつかの機能を研究するために使用することができます。InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide[®] (PKAアンカリングペプチドインヒビター、カタログ番号V8211)ならびに、そのコントロールペプチド、InCELLect™ St-Ht31P Control Peptide[®] (カタログ番号V8221)は精子運動性、形質膜へのアクアポリン-2ポンプ転位、ヒト精子におけるプロゲステロン仲介先体反応におけるPKAの役割を研究する上で好結果をもたらしました(26)。

MAPキナーゼに対するリン酸化特異的 Anti-ACTIVE[®]抗体

新しい遺伝子とその発現産物が発見された場合、細胞抽出物中に存在する何千というタンパク質の中から目的のタンパク質を検出するために、そのタンパク質に特異的な抗体を作成することが望めます。キナーゼに特異的な抗体は、様々な条件下における標的タンパク質の有無あるいは発現レベルを検出する場合にその有用性が示されてきました。さらに抗体が蛍光標識されている場合、*in vivo*における経時的な酵素局在性や活性化の変遷に関する研究に用いることができます。いくつかのタンパク質キナーゼはリン酸化によって調節されることが示されています(それらの活性化は単一あるいは複数のリン酸化によって調節されています)。これは、上流のプロテインキナーゼによる2重リン酸化を受けて活性化するMAPキナーゼに象徴的です(17)。これらのキナーゼカスケードはすべての真核生物で見いだされおり3つのキナーゼモジュールから成り立っています。規範的なMAPKモジュールは3つのタンパク質キナーゼから成り立ちます。MAPKキナーゼキナーゼ(MEKK)は、MAPKキナーゼ(MEK)をリン酸化・活性化し、それは次にMAPK/ERK 酵素をリン酸化・活性化します(17, 27)。哺乳動物細胞にはこのカテゴリーに当てはまる少なくとも3つの主要モジュールが存在し、すべての真核生物で保存されています。これはそれらのモジュールが様々な細胞外シグナルの経路を介していることを示します。その3つのモジュールには Extracellular signal Regulated Kinase (ERK)、c-Jun N-Terminal Kinase (JNK)、p38 MAPKの各経路が含まれます(図3)。

モジュールの最初の酵素であるMEKKは、セリン/スレオニンプロテインキナーゼの酵素グループを代表し、Ser-X-X-X-Ser/Thrモチーフの2つのセリンあるいはセリンとスレオニン残基をリン酸化します。次にその下流の酵素はMAPKのThr-X-Tyrコンセンサス配列のスレオニンおよびチロシン残基をリン酸化します。MAPKスーパーファミリーの重要な特徴は、触媒ドメインの活性化ループに存在するXYモチーフの二重リン酸化により活性化することです。3つのMAPKでは中央のアミノ酸が異なり、ERKではグルタミン酸、JNKではプロリン、p38ではグリシンです。MAKPの活性化にはスレオニンまたはチロシンどちらかのリン酸化だけでは不十分です。これらの酵素の活性化には重リン酸化が必要で、通常スレオニンよりもチロシンが先にリン酸化される2段階の反応です(28)。

MAPK活性の評価は伝統的に2つの実験方法のいずれかによって行なわれています。i) MAPKに特異的な抗体を用いて酵素の免疫沈降を行い、基質としてのミエリン塩基性タンパク質と放射性標識TPを用いて沈殿に含まれる活性化酵素の活性を測定する方法と、ii)ゲル中での活性化MAPKのバンドシフトの観察です。前者は複数のステップを必要とするため時間がかかり、各ステップを酵素活性を正確かつ再現性を持って実施できるように正確に制御することができません。また、免疫沈降では放射性物質を使用する必要も伴います。後者(ゲルシフトアッセイ)ではいつも活性化酵素の正確な評価ができるわけではなく、また同様の分子量を持つ他のタンパク質のバンドがMAPKの近傍にあらわれると、結果の解釈を困難にします。従って、酵素の活性化を正確に判断する簡便な方法が必要とされます。

この目標に向かって、プロメガは各MAPK(ERK、JNK あるいはp38)の2重リン酸化型のみを選択的に検出する抗体の新しいクラスを開発しました。これは、3つのMAPKシグナリングモジュールがその他のシグ

ナリングシステムと協調しながら働くので非常に重要です。これら新規のAnti-ACTIVE[®]抗体は細胞外刺激への正確で経時的な応答における各MAPキナーゼシグナリング経路の役割を研究する上で必要とされる選択的なツールを供給します。2重リン酸化型(活性化型)を検出するだけでなく、これら新しい抗体を用いてMAPKの*in situ*の局在性を観察することによって、活性化の前後におけるMAPKの細胞内局在性を決定することができます(29)。さらに、この抗体を蛍光で標識し、それとは異なる蛍光で標識した抗非リン酸化キナーゼ抗体を組合せれば、細胞ベースのアッセイでFluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)を用いたリン酸化型および非リン酸化型の細胞内部位における局在性決定を行うことができます(30)。抗リン酸化チロシン抗体と同様に、2重リン酸化特異的抗体はU0126などこれら酵素の選択的インヒビターの開発に有用な試薬であることを実証しました(22)。

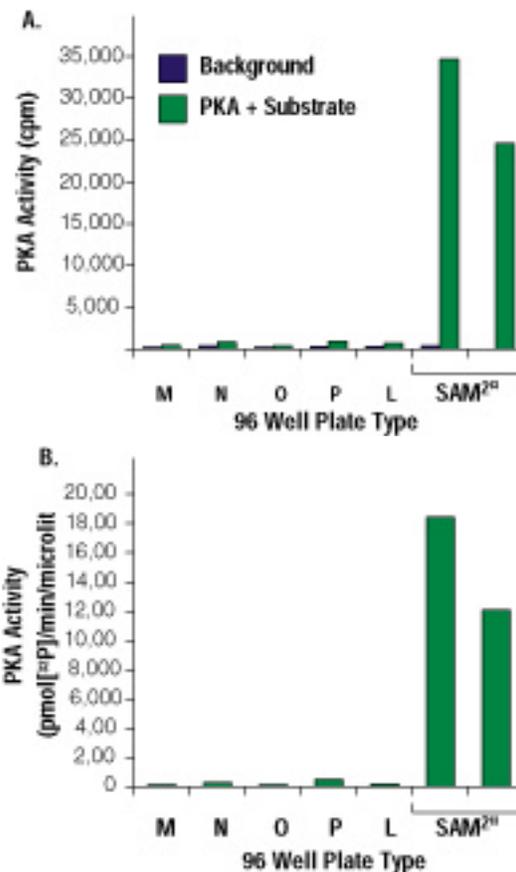


図2. SAM[®] 96 Biotin Capture Plateならびに市販されるいくつかのストレプトアビジンおよびニュートラビジンプレートを用いたPKA活性測定サンプル(5μl)は、5、30、60ならびに20分間それぞれのプレート(L、M、N、O、P、そしてSAM[®])でインキュベートされた(推奨されるインキュベーション時間はSAM[®]プレートでは5分、他のプレートでは120分)。プレートはバキュームマニホールドで洗浄・乾燥した。放射線量はMicroBeta[®] TriLux液体シンチレーションカウンター(EG&G Wallac, Inc.)を用いて測定した。PKA活性は1分あたりのカウント数(cpm)で測定した。測定点間でピオチン化ペプチドの結合に違いが現れなかったため、120分の測定点における結果のみを示した。パネルA: テストした各プレートの1分あたりのバックグラウンド値とPKA活性値。パネルB: テストした各プレートのPKA活性値からバックグラウンド値を引いた値。備考: SAM[®] Plateは、2つのカウント法を用いて測定した。両パネルの対になった棒グラフの左側のデータは、上部光電子増幅管を用いて測定するシンチレーションカウンターを用いて収集した。右側は上下部光電子増幅管を用いて同時に計測することコインシデンスカウンティングにより活性を決定した。同時計測モードは外部光源の計測を防ぐためより正確なデータが得られます。

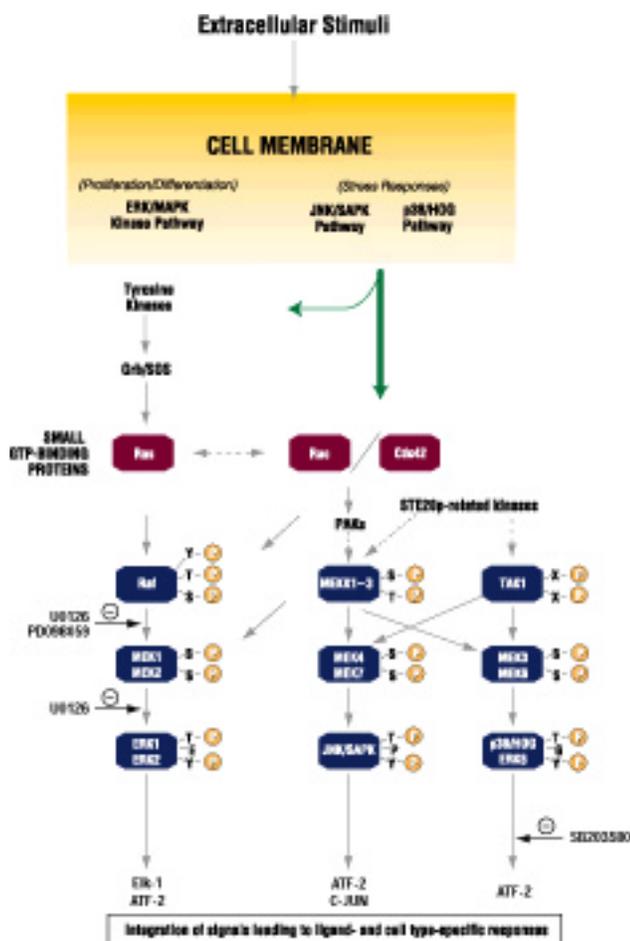


図3. 異なる細胞外刺激による異なるERK/MAPK シグナルカスケードの活性化
MEK Inhibitor U0126が直接作用するのに対して、PD098059はRafキナーゼによるMEK1/2の活性化を阻害する働きがあります。もつつのインヒビター、SB203580はp38のキナーゼ活性を阻害する働きがあります。

まとめ

ヒトゲノムがシーケンシングされ、新しいキナーゼが新規に発見された遺伝子の発現産物として同定されると並行して、キナーゼやホスファターゼ自体やその細胞調節における役割の研究は拡大を続けるでしょう。キナーゼやホスファターゼのハイスループット分析を可能とする試薬や定量システムが、これらの産物の発見と特性解析を促進し、さらには適切な標的の同定と新しい治療法の開発を加速していくことが推測されます。

参考文献

- Hunter, T. (2000) *Cell* **100**, 113.
- Hunter, T. (1998) *Phil. Trans. Royal Soc. London, B*, **353**, 583.
- SMR Committee (1999) *Drug News Perspect.* **12**, 247.
- Goueli, S.A. et al. (1996) *Promega Notes* **58**, 22.
- Goueli, S.A. and Hsiao, K. (1997) *Promega Notes* **63**, 7.
- Casnellie, J.E. (1991) *Meth. Enzymol.* **200**, 115.
- Goueli, B.S. et al. (1995) *Anal. Biochem.* **225**, 10.
- Goueli, S.A., Hsiao, K. and Ruzicka, C. (1997) *Promega Notes* **64**, 2.
- Savage, D. et al. (1992) *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL.
- Toomik, R. et al. (1992) *Meth. Enzymol.* **204**, 311.
- Cisek, L.J. and Corden, J. L. (1991) *Meth. Enzymol.* **200**, 301.
- Meijer, L. (1996) *Trends Cell Biol.* **6**, 393.
- Bhagwat, S.S. et al. (1999) *Drug Discovery Today* **4**, 472.
- Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, R. (1991) *Meth. Enzymol.* **201**, 328.
- Gray, N.S. et al. (1998) *Science* **281**, 533.
- Gum, R.J. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15605.
- Cobb, M.H. (1999) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 479.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205.
- Sivaraman, V.S. et al. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 1478.
- Herlaar, E. and Brown, Z. (1999) *Mol. Med. Today* **5**, 439.
- Dudley, D.T. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7686.
- Favata, M.F. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18623.
- Sebolt-Leopold, J.S. et al. (1999) *Nat. Med.* **5**, 810.
- Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) *Science* **278**, 2075.
- Vijayaraghavan, S. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4747.
- Goueli, S.A. (1999) *Cell Signaling Application Note (AN074)*, Promega Corporation, **4**, 1.
- Lewis, T.S. et al. (1998) *Adv. Cancer Res.* **74**, 49.
- Ferrell, J.E. and Bhatt, R.R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19008.
- Brunet, A. et al. (1999) *EMBO J.* **18**, 664.
- Ng, T. et al. (1999) *Science* **283**, 2085.

Anti-ACTIVE, PepTag, SAM2 and SignaTECT are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. InCELLect is a trademark of Promega Corporation.

MicroBeta is a registered trademark of EG&G Wallac, Inc. TopCount is a registered trademark of Packard. Western-Star is a trademark of Tropix, Inc. PhosphorImager is a registered trademark of Amersham Pharmacia Biotech, Ltd.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
SAM [®] Biotin Capture Membranes	96サンプル	V2861	39,000
	7.6 × 10.9cm	V7861	39,000
SAM [®] 96 Biotin Capture Plates	96ウェル	V7541	39,000
	5 × 96ウェル	V7542	156,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MEK Inhibitor U0126	5mg (5 × 1mg)	V1121	32,000
Anti-ACTIVE [®] MAPK pAb, Rabbit, (pTEpY)	40µl	V8031	65,000
Anti-ACTIVE [®] ERK1/2 pAb, Rabbit	40µl	V1141	35,000
Anti-pT ¹⁸³ MAPK pAb, Rabbit	50µl	V8081	65,000
Anti-ACTIVE [®] JNK pAb, Rabbit, (pTppY)	40µl	V7931	65,000
	120µl	V7932	130,000
Anti-ACTIVE [®] p38 pAb, Rabbit, (pTGpY)	100µl	V1211	65,000
PPase-2A Catalytic Subunit	25 units	V6311	59,000
PC12 Cell Extracts, Western Controls			
Sorbitol/Untreated	10 blots	V8100	15,000
NGF/Untreated	10 blots	V8110	15,000
Donkey Anti-Rabbit, IgG, (H+L) HRP	60µl	V7951	15,000
Donkey Anti-Rabbit, IgG, (H+L), AP	60µl	V7971	15,000
Protein Kinase C (Rat Brain)	1µg	V5261	68,000
SignaTECT [®] Protein Kinase C Assay System ^(a)	96 回分	V7470	50,000
PepTag [®] Non-Radioactive Protein Kinase C Assay ^(b)	120 回分	V5330	53,000
Myristoylated PKC Peptide Inhibitor	1mg	V5691	10,000
InCELLect [™] AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide	150µl	V8211	45,000
InCELLect [™] St-Ht31P Control Peptide	150µl	V8221	45,000
cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit Type II (Bovine Heart)	2,500u	V5161	25,000
SignaTECT [®] cAMP-Dependent Protein Kinase Assay System	96 回分	V7480	50,000
PepTag [®] Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay ^(b)	120 回分	V5340	53,000
cAMP-Dependent Protein Kinase Peptide Inhibitor	1mg	V5681	24,000
cAMP, 1mM	500µl	V6421	6,000

^(a)Patent Pending.

^(b)U.S. Pat. No. 5,580,747.