

α -1,3/4-L-Fucosidase

Code No. 4453

Size: 100 μ U/100 μ l

Systematic name: α -L-Fucoside fucohydrolase

Enzyme code: 3.2.1.51

Source: *Streptomyces* sp. 142

Form:
Solution in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.1 M NaCl, 0.02% NaN₃ and 0.1% Brij-58.

Storage: 4°C

Reaction:
This enzyme catalyses the hydrolytic cleavage of α -fucoside bond and the L-fucose is released.

Substrate specificity:

- This enzyme specifically cleaves α 1, 3- and α 1, 4-fucoside bond.
- This enzyme also releases L-fucose from α 1-acid glycoprotein.

Properties:

Molecular weight: 40,000 (Gel filtration method)

Michaelis constant:

- K_m=10.1 μ M (PA-Lacto-*N*-fucopentaose II: Table 1, Substrate 1)
- K_m=1.08 μ M (PA-Lacto-*N*-fucopentaose III: Table 1, Substrate 2)

Optimum pH: pH 6.0 (Table 1, Substrate 2)

Range of pH stability: pH 4.5 - 7.0 (37°C, 60 minutes)

Stabilizer: 0.1% NP-40, 0.1% Brij-58, and 0.02% BSA

Definition of activity:
One unit is the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of pyridylamino lacto-*N*-fucopentaose III within 1 minute at 37°C at pH 6.0.

Purity:

<Protease Contamination>

No protease activity is detected after incubation of 10 μ U α -1,3/4-L-Fucosidase with 4 nmol oxidized insulin B chain for 16 hours at 37°C, in 20 μ l of 150 mM phosphate buffer, pH 7.5.

<Exoglucosidase Contamination>

No detectable α -galactosidase, β -galactosidase, β -*N*-acetylglucosaminidase, α -mannosidase, and β -xylosidase activities are detected when 20 μ U α -1,3/4-L-Fucosidase is incubated with 100 nmol of a *p*-nitrophenyl glycoside for 16 hours at 37°C, in 0.1 ml of 300 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0.

References:

- 1) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem.* (1992) **267**: 1522-1527.
- 2) Kondo A, Suzuki J, Kuraya N, Hase S, Kato I, and Ikenaka T. *Agric Biol Chem.* (1990) **54**: 2169-2170.
- 3) Suzuki J, Kondo A, Kato I, Hase S, and Ikenaka T. *Agric Biol Chem.* (1991) **55**: 283-284.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6973 or from our website at www.takara-bio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

α -1,3/4-L-Fucosidase

Code No. 4453 容量：100 μ U/100 μ l

- 系統名 α -L-Fucosidase
- 酵素番号 3.2.1.51
- 由来 *Streptomyces* sp.142
- 形状 溶液凍結品
[0.1 M NaCl、0.1% Brij-58、0.02% アジ化ナトリウムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)]
- 保存 4°C
- 反応 α フコシド結合に作用し L-fucose を遊離する。
- 基質特異性
・ α -1,3 および α -1,4 フコシド結合を特異的に切断する。
・ α 1- 酸性糖タンパク質より L-fucose を遊離する。

●一般的性質

分子量： 約 40,000 (ゲルろ過法)
ミカエリス定数：
 $K_m = 10.1 \mu\text{M}$ (PA-lacto-*N*-fucopentaose II : Table 1, Substrate 1)
 $K_m = 1.08 \mu\text{M}$ (PA-lacto-*N*-fucopentaose III : Table 1, Substrate 2)

至適 pH： pH6.0 (Table 1, Substrate 2)
pH 安定領域： pH4.5 ~ 7.0 (37°C、60 min.)
安定化剤： 0.1% NP-40、0.1% Brij-58、0.02% BSA

●活性の定義

37°C、pH6.0 において、PA-lacto-*N*-fucopentaose III (Table 1, Substrate 2) から 1 分間に 1 μ mol の PA-lacto-*N*-neotetraose を生成する酵素活性を 1 U とする。

●活性測定法

2 μ M の PA-lacto-*N*-fucopentaose III (Table 1, Substrate 2) を基質として、30 mM リン酸カリウム緩衝液 pH6.0 中、37°C で 20 分間反応を行った後、1% トリフルオロ酢酸溶液 40 μ l を加えて反応を止める。反応液を HPLC で分析し、生成物のピーク面積から酵素活性を算出する。

●純度

< 残存プロテアーゼ活性 >

本酵素標品 10 μ l に、0.4 mM 酸化インスリン B 鎖を含む 300 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 10 μ l を加えて、37°C、16 時間反応を行った反応液を逆相系 HPLC で分析した結果、基質 (酸化インスリン B 鎖) 以外のピークを認めなかった。

< 残存エキソヌクレアーゼ活性 >

本酵素標品 20 μ l と各基質 100 nmol とを 300 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0、最終液量 0.1 ml) 中にて 37°C、16 時間反応させた後 1 M 炭酸ナトリウム 0.2 ml で反応を停止し、405 nm における反応液の吸光度を測定した結果、吸収の増加を認めなかった。

(使用基質) *p*-NP- α -D-Galactoside
 p-NP- β -D-Galactoside
 p-NP- α -D-Mannoside
 p-NP- β -D-Xyloside
 p-NP- β -*N*-Acetylglucosaminide
 p-NP- α -L-Fucoside
 (*p*-NP : *p*-nitrophenyl)

●参考文献

- 1) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem.* (1992) **267**: 1522-1527.
- 2) Kondo A, Suzuki J, Kuraya N, Hase S, Kato I, and Ikenaka T. *Agric Biol Chem.* (1990) **54**: 2169-2170.
- 3) Suzuki J, Kondo A, Kato I, Hase S, and Ikenaka T. *Agric Biol Chem.* (1991) **55**: 283-284.

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v201812Da

α -1,3/4-L-Fucosidase

Table 1. Substrate specificity of α -1,3/4-L-Fucosidase

No.	Substrate	Specific activity (mU/mg)	Relative activity (%)
1	PA-Sugar Chain 044 (Cat. #4144) Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 4	819.2	100
2	PA-Sugar Chain 045 (Cat. #4145) Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 3	460.9	56.3
3	PA-Sugar Chain 046 (Cat. #4146) Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 4	68.5	8.36
4	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 4	0.106	0.01
5	Sialyl Lex Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 3	0.101	0.01
6	PA-Sugar Chain 005 (Cat. #4105) Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 \nearrow 6 Gal β 1-4GlcNAc β 1 \nearrow 4 Fuc α 1 \nearrow 3 Gal β 1-4GlcNAc β 1 \nearrow 2 Man α 1 \nearrow 3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	201.3	24.6
7	PA-Sugar Chain 049 (Cat. #4149) Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc-PA	0	0
8	PA-Sugar Chain 043 (Cat. #4143) Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	0	0
9	PA-Sugar Chain 048 (Cat. #4148) GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1 \nearrow 2 Fuc α 1 \nearrow 4	0	0
10	PA-Sugar Chain 009 (Cat. #4109) Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 \nearrow 6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 \nearrow 3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA Fuc α 1 \nearrow 6	0	0

PA: Pyridylamino (group) PA-Sugar chain was derivatized according to the method of Kondo *et al.*

α -1,3/4-L-Fucosidase

Application 1 : α -1,3/4-L-Fucosidase による PA 化糖鎖の酵素消化

Table 1 の糖鎖を基質として下記の条件で Fucosidase 消化を行った。

●反応液組成

10 μ M 糖鎖	2 μ l
500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)	2 μ l
酵素溶液	X μ l
滅菌精製水	6 ~ X μ l
Total	10 μ l

●操作手順

上記反応液を 37°C で 30 分間あるいは 60 分間保持後、1%トリフルオロ酢酸溶液 40 μ l を加えて反応を停止し、HPLC 分析に供する。

●結果

糖鎖 (Number of Table 1)	酵素量 (μ U)	生成物	加水分解率 (%)	
			30 min.	60 min.
1	1	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	100	100
2	1	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	95	100
3	5	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	77	100
6	2	 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA Gal β 1-4GlcNAc β 1-4 Man α 1-3 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-6	91	100
8	5	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	0	0

Application2 : α -1,3/4-L-Fucosidase による糖タンパク質の酵素消化

α 1-酸性糖タンパク質 (α 1-AGP) は、分子量 44,000 の血清糖タンパク質で約 45% の糖を含んでいる。糖鎖は分子内の 5 個の Asn 残基に N-グリコシド結合しており、その構造は N-Acetyl-lactosamine type のバイアンテナ、トリアンテナ、テトラアンテナ型糖鎖である。トリアンテナ、テトラアンテナユニットの非還元末端側の GlcNAc の 3 位には Fuc が α 結合しており、この Fuc 残基を遊離させるために α -1,3/4-L-Fucosidase を用いた。

●操作手順

α 1-AGP 50 pmol と α -1,3/4-L-Fucosidase 25 μ U と 2 M 硫酸アンモニウムを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 10 μ l を 37°C、20 時間保持後、1%トリフルオロ酢酸溶液 20 μ l を加えて反応を停止する。このうち 20 μ l を乾固し、PALSTATION を用いて PA 化反応を行い、酵素反応によって遊離した L-Fucose を PA 化する。PA-Fucose は陰イオン交換カラム (PALPAK TypeA) を用いた HPLC 分析³⁾により定量する。

●結果

本酵素の糖タンパク質に対する活性は硫酸アンモニウムの添加により著しく上昇した。

切断条件	遊離した L-Fucose 量 (%)
Acid Hydrolysis *	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ , (-)	11
(NH ₄) ₂ SO ₄ , (+)	101

* : 4 M trifluoroacetic acid 100°C、3 hr

α -1,3/4-L-Fucosidase

Application 1 : Enzymatic cleavage of PA-Sugar chain with α -1,3/4-L-Fucosidase

The reactions were performed using PA-sugar chains in Table 1 as substrates.

The reaction mixture was as follows :

10 μ M PA-Sugar chain	2 μ l
500 mM Potassium phosphate buffer, pH 6.0	2 μ l
Enzyme solution	X μ l
Sterile purified water	6 - X μ l
Total	10 μ l

The reaction mixture was incubated at 37°C for 30 min or 60 min, then 40 μ l of 1% trifluoroacetic acid was added to reaction mixture to stop the reaction. The reaction mixture was analyzed by HPLC.

Result :

Substrate (Number of Table 1)	Amount of enzyme (μ U)	Cleaved product	Rate of hydrolysis (%)	
			30 min	60 min
1	1	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	100	100
2	1	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	95	100
3	5	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	77	100
6	2	 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Man α 1 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	91	100
8	5	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA	0	0

Application 2 : Enzymatic cleavage of glycoprotein with α -1,3/4-L-Fucosidase

α 1-acid glycoprotein (α 1-AGP) is the serum glycoprotein, M.W. 44,000 and it contains approx. 45% of sugar in the molecule. Its sugar chains are linked to five intramolecular Asn residues by *N*-glycoside bond and its structures are *N*-Acetylglucosamin type biantennary, triantennary, and tetraantennary sugar chains.

Since a fucose is linked to the nonreducing terminal GlcNAc of triantennary or tetraantennary unit by α -1,3 bond, α -1,3/4-L-Fucosidase was used to release the fucose.

50 pmol of α 1-AGF and 25 μ U of α -1,3/4-L-Fucosidase was incubated at 37°C for 20 hours in 10 μ l of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0, containing 2 M ammonium sulfate, then 1% trifluoroacetic acid was added to reaction mixture to stop the reaction.

20 μ l of reaction solution was dried, then the released fucose was pyridylaminated by using PALSTATION. PA-fucose was determined by HPLC using the anion exchange column (PALPAK Type A).³⁾

Result :

The activity of this enzyme for glycoprotein was increased by adding ammonium sulfate remarkably.

Cleavage Condition		Amount of released L-Fucose (%)
Acid Hydrolysis *		100
Enzymatic Cleavage	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (-)	11
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (+)	101

* 4 M trifluoroacetic acid 100°C, 3hr