

D206

アニオン性ポルフィリン誘導体によるタンパク質認識・変性 における構造因子の評価

(宮崎大工)○(学)武藤 洋・(正)大島 達也*・(正)馬場 由成

1. 緒言

タンパク質立体構造の外表面を識別することのできる合成レセプター分子はタンパク質同定のセンシング材料や、酵素反応やタンパク質-タンパク質複合体形成における調節因子、変性剤あるいは阻害剤としての有用性が高いため、近年このような概念に基づいたタンパク質表面認識が研究されている。¹⁾本研究では側鎖に複数のアニオン性官能基を有するテトラフェニルポルフィリン誘導体とその類縁化合物によるタンパク質の変性を円偏光二色性(CD: Circular Dichroism)スペクトルにより評価し、タンパク質を認識するためのレセプターの構造因子について考察した。

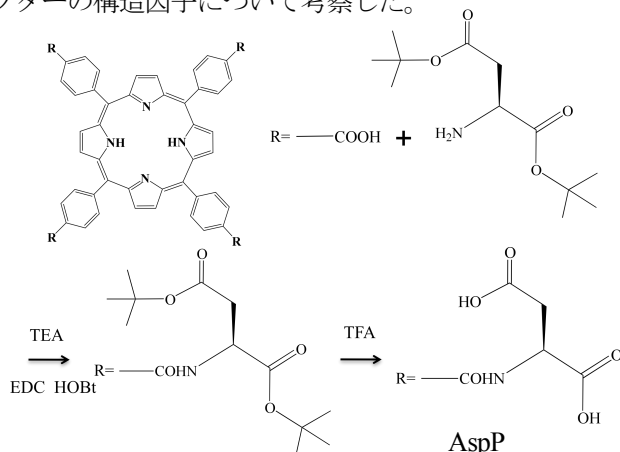


Fig.1 Synthetic scheme of AspP.

2. 実験操作

側鎖にアスパラギン酸を導入したポルフィリン誘導体(AspP, Fig.1)は2段階を経て合成し、¹H-NMRにより同定した。所定のpHに調整した10 mmol・dm⁻³リン酸緩衝液、1.25-80 μmol・dm⁻³のAspP溶液、20 μmol・dm⁻³のlysozyme水溶液をそれぞれ調製し、1 cm³ずつ混合して3 cm³とした。混合溶液のCDスペクトルを測定し、2次構造に基づく230 nm付近の極大値(θ_{\max})を求めた。同様に、類縁化合物TCPP、PPDNa、DLFP (Fig.3)を用いてlysozymeの認識・変性挙動をRelative Denaturation (RD)

$= 1 - (|\theta_{\max, c}| / |\theta_{\max, 0}|)$ により評価した。

3. 結果および考察

Fig.2にpH8におけるAspP存在下でのlysozymeのCDスペクトルを示す。図より、AspPとの相互作用によってlysozymeが変性することをCDにおける2次構造由来のピークの減少より確認できた。pH8においてAspPはカルボキシル基が解離し負電荷を帯びている。一方、等電点11.1で塩基性タンパク質に分類されるlysozymeは正電荷を帯びているため、静電的相互作用に基づいた複合体形

成に伴う変性が確認された。また、Fig.4においてカルボキシル基を4つ有するTCPPやカルボキシル基の数が異なる類縁化合物を用いて各種タンパク質に対して同様の実験を行った結果、1分子内に最も多くカルボキシル基を有するAspPがlysozymeに対する最も強い変性作用を有する事が示された。

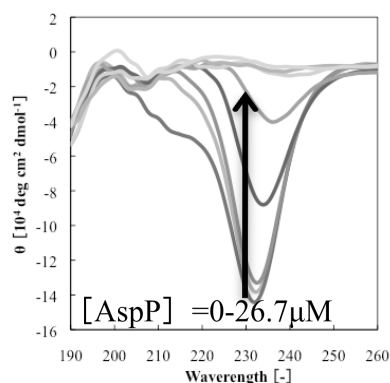


Fig.2 CD spectra of lysozyme in the presence of AspP at pH8.

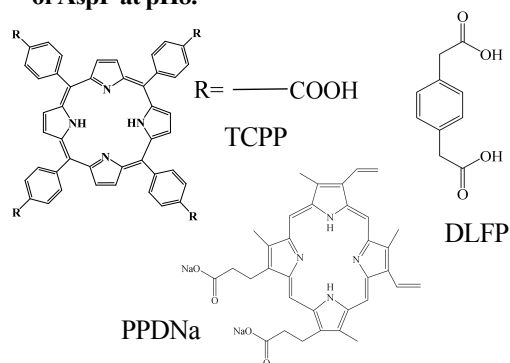


Fig.3 Molecular structures of denaturants used in this study.

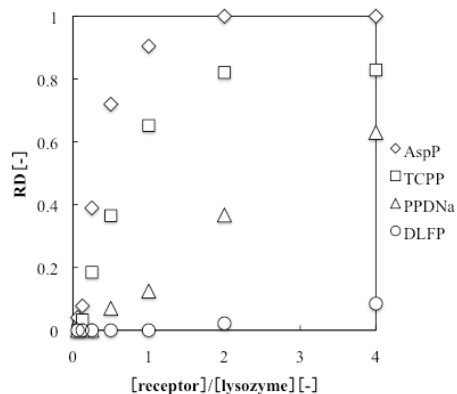


Fig.4 Denaturation profiles of lysozyme using different denaturants at pH8.

Reference

- 1) H. Yin, A.D Hamilton. Angew. Chem. Int. Ed., 2005; 44: 4130-4163
*e-mail: oshimat@cc.miyazaki-u.ac.jp