

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 14 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

| | | |
|---|-----------|--------------------------------|
| 課題名 | | CCN タンパク質 2 の立体構造の決定 |
| 研究代表者 | 氏名 | 滝川 正春 |
| | 所属機関名・部局名 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科/歯学部先端領域研究センター |
| | 職名 | 教授 (特任) |
| 事業名 (該当の事業名の右欄に○) | ○ | 共同研究員 |
| | | 超高磁場 NMR 共同利用研究課題 |
| | | クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題 |
| | | 客員フェロー |
| 蛋白研受入担当教員名 | | 鈴木 守 准教授 |
| <p>市販の CCN2 タンパク質 1mg 分を acetate buffer (pH 4) で溶解し、混在する安定化剤を spin カラムで除去しながら 5mg/ml にまで濃縮した。これを用いて、摂氏 20 度、8 プレート、約 800 条件で、結晶化実験を行った。また、摂氏 4 度の結晶化実験を行うべく、同タンパク質 1mg を acetate buffer (pH 4) で溶解し、spin カラムでさらに濃縮したところ、20mg/ml まで濃縮できた。本標品は、KEK への搬送と保存期間約 3 日の間に、サンプル分取ができないほど、非常に粘性の高い部分ができていたので、分取できる部分をタンパク質濃度 12mg/ml にしてクリスタルスクリーン 1,2(96 条件)で結晶化実験に供した。その結果、8 ヶ月観察したが、結晶らしきものは確認できなかった。ただ、どのプレートも半数以上のドロップで沈殿のようなものが確認され、その量は高濃度タンパク質溶液の方が多かった。これらの結果から、現状の精製条件の CCN2 単体の結晶化を行う場合は 5mg/ml のタンパク濃度で問題ないと思われた。これらの結果を踏まえ、今後さらなる条件検討を行うことが必要である。</p> <p>しかし、上記の結果から、CCN2 単体での結晶化が難しい場合を考慮して、CCN2 に high affinity で結合する成長因子 FGF2 との複合体の調製も試みた。CCN2 と FGF2 を PBS 中で混合し、CCN2-FGF2 複合体の affinity レジン (バッチ法) での精製を試みたが、溶出液には全く何も検出されず、溶出後のレジンから CCN2 に相当する分子量のタンパク質を認めたものの複合体は全く確認できなかった。即ち、生理的条件を重視して PBS 溶液で複合体形成を試みたものの、PBS では沈殿し易い CCN2 がこの高濃度ではやはり不溶化してしまい、複合体形成前に沈殿したものと考えられた。そこで、CCN2 の溶解度が高い酸性溶液で反応させるため、CCN2 の溶媒 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.0) と FGF2 の溶媒 PBS (pH7.4) を混合し、pH4.0 付近になる比率を決定して、この条件で両タンパク質を混合して一定時間反応させた後、遠心して不溶物を除いた上清を限外濾過膜付き Spin カラムで遠心し、濾液と残留液に分けたところ、濾液には FGF2 が存在したが、CCN2 は濾液にも残留液にも見られず、遠心した不溶物中に認められた。これらのことから、混合溶媒に塩基性タンパク質である FGF2 を高濃度に加えたために溶液全体の pH が上昇し、不溶化した CCN2 が限外濾過する前に沈殿してしまったものと考えられた。従って、複合体の調製も他の分子との複合体の調製も視野に入れてさらなる検討が必要と考えられる。</p> | | |