

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 10 日

2020 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>前年度の報告書に記載したように、CCN2-FGF2 複合体の結晶化について、CCN2 の沈殿が混在していても結晶とは区別できそうであること、結晶化プレートには種々の pH の条件が含まれていることから、CCN2 in acetate buffer と FGF2 を acetate buffer(pH4)で高濃度に溶解したものとで混合液を作り、そのまま結晶化プレート 10 枚に添加することにより、どれか結晶化する適切な条件に遭遇する可能性を追求した。即ち、R&D 社製の FGF2 の場合は DW で再構築しても酸性溶液 (pH4 程度) になることがわかったことから、両者の高濃度溶液 5mg/mL (各 1mg) を混合したところ白濁したが、遠心して沈殿を除きその上清をそのまま結晶化に供した。約 3 ヶ月後結晶らしきものが観察できた 5 ドロップを回折実験に供したが、どれも低分子化合物であった。因みに、遠心上清中の CCN2 (すべて FGF2 とモル比 1 : 1 で複合体を形成していた) は 0.35mg/ml(全重量 0.14mg)しか存在せず、大半の CCN2 は沈殿してしまっていることが分かった。</p> <p>そこで、CCN2 と FGF2 をモル比 1 : 2 にて低濃度で混合したのち、分子量 50KDa の限外濾過膜 (Amicon Ultra-50 スピнкаラム) で FGF2 を除去し、複合体を濃縮する方法をとれば、できるだけ沈殿が生じる可能性を抑え、高収量で複合体のみを得ることができると考え、共に 0.5mg/ml の濃度の CCN2 と FGF2 を混和したところ、不溶物らしきものが目視できたので、遠心後、上清の CCN2 タンパク量をウェスタンブロットで確認すると 50%程度に減少していた。さらに、上清を上記のスピнкаラムで限外濾過すると flow through には CCN2 は認められなかったが、フィルター膜に吸着しておりさらなるロスが生じていた。次に、混和時の沈殿をさけるべく、さらに低濃度で溶解した CCN2 と FGF2 (共に 0.1mg/ml) を混合し、スピнкаラムで複合体のみを分離することを試みたが、10%程度しか upper chamber 中に存在しない事が判明した。</p> <p>以上、FGF2 との複合体形成実験は、これまでの実験結果から今後も困難を伴う事が考えられる。そこで、FGF2 との複合体形成実験は一旦休止して、2021 年度から CCN2 と同様の酸性条件での溶解度が高く、CCN2 と高親和性で結合するタンパク質を用い、複合体の形成とその結晶化実験を行う予定である。</p>			