

透明帯構成タンパク質の小角 X 線散乱解析 Structural analysis of zona pellucida proteins by small angle X-ray scattering

浅井奈穂*, 田中宏明, 織田美咲, 太田賢志, 米澤直人

千葉大学大学院理学研究科, 〒263-852230 千葉市稲毛区弥生町 1-33

Naho Asai*, Hiroaki Tanaka, Misaki Orita, Satoshi Ohta and Naoto Yonezawa

Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

1 はじめに

卵子は卵外被で包まれており、哺乳類ではこの卵外被は透明帯 (zona pellucida) と呼ばれる。透明帯は 3 ないし 4 種類の糖タンパク質で構成された多孔性のスポンジ状物体である [1]。ウシの場合、ZP2, ZP3, ZP4 の 3 種類で構成されている。ZP2 は、受精成立に伴い卵子表層顆粒から放出される ovastacin により一カ所特異的切断を受ける (図 1、ZP2、黒矢印)。これが引き金となって透明帯の立体構造が変化し多精拒否を引き起こすと考えられている。しかし、この切断が多精拒否へつながる機構は不明である。これらの構成タンパク質は重合能のない前駆型膜タンパク質として合成され、卵細胞膜上で CFCS の特異的切断により成熟型になるとともに重合を開始する。前駆型全長 ZP3 と ZP-N 等ドメインの結晶構造は報告されているが [2,3]、成熟型全長や複合体の高次構造はわかっていない。当グループは ZP2 の特異的プロセッシングによる構造変化をあきらかにすることを目標として、まずは切断前の成熟型ウシ ZP2 の溶液構造解析を試みた。

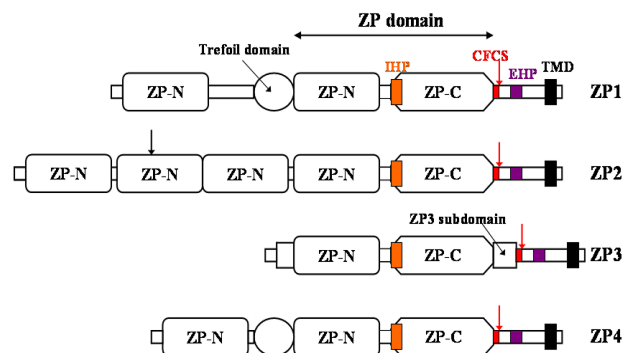


図 1 : 透明帯構成タンパク質の模式図

2 実験

ウシ ZP2 成熟型全長 (図 1、N 末から ZP-C まで) と N 末端フラグメント (ZP2 フラグメント、図 1、ZP-C を除いた領域) をバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系で分泌タンパク質として発現させ、N 末端に付加した His タグを利用してアフィニティー精製した。全長の組換えタンパク質については収量が低く解析へ進めることを断念し、ZP2 フラグメントを大量発現させた。Superdex 200 を用いたゲル濾過の

分画を限外ろ過で濃縮し、濾液を対照として小角 X 線散乱を行った。ゲル濾過溶離液は 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 10%(w/v) glycerol, pH 7.5 を用いた。測定は、BL-6A で行い、カメラ長 2 m、波長 1.5 Å、セル 25°C、検出器 Pilatus 3 1M であった。標準タンパク質として卵白アルブミンを用いた (0.89, 1.59, 2.60, 3.06, 4.33 mg/ml)。ZP2 フラグメントの濃度は 0.560, 0.587, 1.202, 1.749, 1.776 mg/ml であった。

3 結果および考察

成熟型 ZP2 全長に対して ZP2 フラグメントは収量が高く、ゲル濾過および小角 X 線散乱に供することが可能であった。ZP2 フラグメントの散乱曲線 (図 2) を ATSAS パッケージを用いて解析したところ、5 点の濃度のうち 3 点のデータのみを利用することによって解析を進めることができた。不確かなながらも構造モデルまで到達することができ (図 3)、ZP-N ドメインが 4 個並んだ構造に矛盾しない、球状ドメインが連結した構造モデルが得られた。

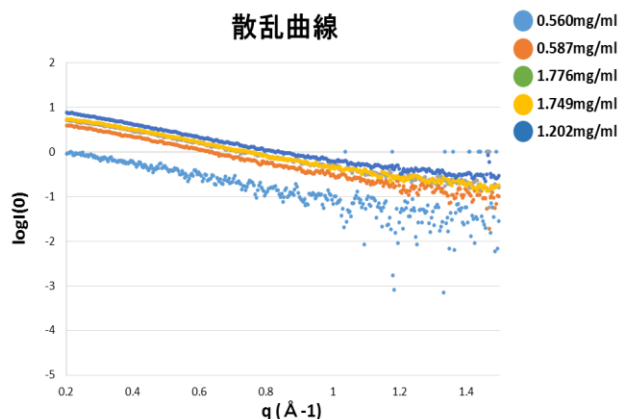


図 2 : ZP2 フラグメントの散乱曲線

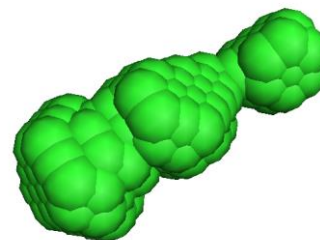


図 3 : ZP2 フラグメントの DAMMIN MODEL

4 まとめ

ウシ ZP2 フラグメントは全長 ZP2 に比べ収量が良く凝集性が低いことから、小角 X 線散乱による構造解析の良い対象であることがわかった。

謝辞

この測定は、清水先生、西條先生、森先生など PF スタッフの方々が作業して頂いた結果、可能となったものです。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] N. Yonezawa, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **759**, 111 (2014)
- [2] L. Han *et al.*, *Cell* **143**, 404 (2010)
- [3] M. Monné *et al.*, *Nature* **456**, 653 (2008)

*nahoasai0930@gmail.com