

哺乳類卵外被糖タンパク質の X 線小角散乱による構造解析  
Structural analysis of mammalian egg coat glycoproteins by small angle X-ray scattering

鈴木七緒<sup>1</sup>, 米澤直人<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>千葉大学大学院自然科学研究科, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

<sup>2</sup>千葉大学大学院理学研究科, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

Nanao Suzuki<sup>1,\*</sup> and Naoto Yonezawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Chiba Univ. 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Chiba Univ. 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

## 1 はじめに

受精の分子機構は魚類、棘皮動物で解明が進んでいるが、哺乳類ではまだよくわかっていない。卵子はスポンジ状の卵外被で包まれており、哺乳類では卵外被は透明帯と呼ばれ、ブタ透明帯の場合、直径 150  $\mu\text{m}$ 、厚さ 15  $\mu\text{m}$  である。透明帯は 3 ないし 4 種類の糖タンパク質で形成されており、ヒトでは 4 種類 (ZP1,ZP2,ZP3,ZP4) であるが、当研究の対象とするブタ、ウシでは 3 種類 (ZP2,ZP3,ZP4) である。受精のときに、精子は透明帯に結合し、透明帯を通り抜け、卵細胞に到達する。透明帯には同じ動物種の精子を選択的に結合する役割と受精完了後の余分な精子の侵入を防ぐ多精拒否の役割がある。

これらの糖タンパク質は重合能のない前駆体として合成され、卵細胞表面で 1 ヶ所特異的に切断され成熟体となるとともに重合を開始する。スウェーデンのグループにより、2008 年にはマウス ZP3 のドメイン構造が [1]、2010 年にはニワトリ ZP3 前駆体の全体構造 [2] が結晶構造解析により決定された。しかし、成熟体の構造は未解明で、重合開始に至る構造変化はわかっていない。成熟体は前駆体よりも凝集しやすいため結晶化はさらに困難であると予想されている。受精完了後 ZP2 が 1 ヶ所特異的に切断されることにより透明帯の構造変化が起こり精子と結合しなくなることがわかっているが、特異的切断でどのような構造変化が起こるのかはわかっていない。糖鎖部分が精子の結合に必要なが、タンパク質と糖鎖の位置関係はわかっていない。

本課題では X 線小角散乱により成熟体と前駆体の立体構造を比較することを当面の目標とし、凝集を抑えた状態で構造情報を得ることができるかどうかを検討した。

## 2 実験

ブタ卵巣より単離した透明帯を熱可溶化し、エンド  $\beta$  ガラクトシダーゼ消化により糖鎖不均一性を減少させた。逆相 HPLC によりブタ ZP3 成熟型と ZP4 成熟型とを分離し、凍結乾燥後 Superdex 200 による

ゲルろ過を行った。ZP3 はダイマーとして ZP4 はモノマーとして溶出した。溶離液には 25 mM Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl を用いた。回収試料に 5% となるように glycerol を加え Amicon ultrafree (Millipore) による限外濾過で濃縮し測定試料とした。ウシ ZP3 前駆体と ZP4 前駆体をバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を利用し分泌型として発現させた。培地から TALON アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより目的タンパク質を部分精製した。Superdex 200 によるゲルろ過を行い ZP3 をダイマーとして、また ZP4 をモノマーピークとして回収した。同様に 5% glycerol を加え濃縮し測定試料とした。SAXS 測定は、フォトンファクトリーの BL-10C ビームラインを用いて行った。カメラ長は 2 m、検出器は R-AXISVII (Rigaku) を用いた。露光時間は 10 分で測定を行った。

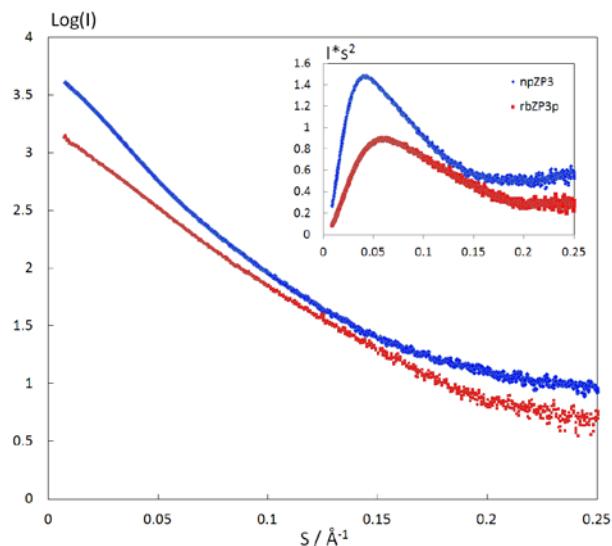


Fig.1 天然ブタ ZP3 成熟体(npZP3, 青)と組換えウシ ZP3 前駆体(rbZP3p, 赤)の散乱曲線と Kratky plots

## 3 結果および考察

今回のビームタイムでは、天然のブタ ZP3 とブタ ZP4、そして組換え体ウシ ZP3 前駆体とウシ ZP4 前駆体の SAXS 測定を行った。タンパク質が凝集し

やすいため、モノマーあるいはダイマーの状態測定できるようにサンプル濃度と buffer 条件を検討した。低いサンプル濃度でかつ Glycerol を加えた条件で凝集を抑えたサンプルの測定が可能であった (Fig.1)。

しかし、標準として調製したオバルブミンが凝集しており、構造解析が進められなかった。

#### 謝辞

本研究は清水伸隆博士を始めとするスタッフの方々のご指導のもとで行われました。ここに感謝致します。

#### 参考文献

- [1] Monne M *et al.* *Nature* **456(7222)**, 653 (2008)
- [2] Han L *et al.* *Cell* **143(3)**, 404 (2010)

\* nyoneza@faculty.chiba-u.jp