

毛髪内タンパク質脱イミノ化酵素の基質認識機構についての構造学的研究 Structural Analysis of the Substrate Recognition by Peptidylarginine Deiminases in Hair

海野昌喜^{1,2*}, 西條慎也³, 清水伸隆³, 秋元恵^{1,2}, 眞下隆太朗^{1,2}, 永井杏奈^{1,2}, 高原英成^{2,4}

¹茨大・院理工, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

²茨大・フロンティア, 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1

³高エネ研・物構研, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

⁴茨大・農, 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1

Masaki Unno^{1,2*}, Megumi Akimoto^{1,2}, Ryutaro Mashimo^{1,2}, Kenji Kizawa³, Hidenari Takahara^{2,4}

¹Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

²Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, Naka, Ibaraki 319-1106, Japan

⁴Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology, Department of Applied Biological Resource Sciences, Ibaraki University, 3-21-1, Chuo, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393, Japan

要旨： 蛋白質脱イミノ化酵素 (peptidylarginine deiminase, PAD) は基質タンパク質のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾酵素である。ヒトなどの哺乳類には PAD1 ~ 4, PAD6 の 5 種類のアイズォイムが存在し、毛包には PAD のアイズォイム PAD1 ~ PAD3 の三種が発現している。本研究では、PAD1, PAD2, PAD3 による基質認識機構の構造的基盤を明らかにしようと、PAD1, PAD3 の X 線結晶構造解析と、X 線小角散乱による溶液構造解析を行った。論文未発表のため詳細は記せないが、PAD1, PAD3 には大きな構造の違いがあることが明らかになってきた。この構造の違いが基質認識機構の違いに関係があると考えている。

1 はじめに

毛髪キューティクル細胞に多量発現する S100A3 タンパク質 (S100A3) は、EF ハンド型 Ca^{2+} 結合タンパク質である。S100A3 は、共局在する蛋白質脱イミノ化酵素 (peptidylarginine deiminase; PAD) III 型アイズォイム (PAD3) の天然基質であり、S100A3 の 4 つのアルギニンのうち Arg51 だけが特異的にシトルリン化という翻訳後修飾を受ける。Arg51 がシトルリン化した S100A3 は、二量体から四量体に構造変化を起こし、同時に Ca^{2+} と Zn^{2+} の親和性が協同的に上がる。PAD 酵素が Ca^{2+} 依存的に活性化されることから、PAD3-S100A3 の系は、上皮バリアー形成過程の $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ホメオスタシスに関わる生化学プロセスに於いて、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ シグナル伝達タンパク質系として働く重要な機能分子であることが明らかになってきた。毛包には、PAD3 の他に、PAD1, PAD2 というアイズォイムが存在している。興味深いことに PAD1, PAD2 は試験管内では S100A3 の全てのアルギニン (Arg3, Arg22, Arg51, Arg77) をシトルリン化する。この基質認識の違いはどのような構造的な要因によるものか、ということが一つの興味の対象になっている。昨年度までに、PAD1 の結晶の非対称単位には、PAD1 単量体が二分子含まれることがわかった。ゲル濾過の結果では、110 ~ 120 kDa 程度の個所にピークが見られ、単量体

(75 kDa) か二量体 (150 kDa) かは明確に決定できなかった。静的光散乱装置による推定では、二量体に近い値を得たが、アグリゲーションの部分も大きく、さらなる解析が必要であった。もし二量体で存在すると考えると、非対称単位の取り方により、二通りの二量体構造が考えられ、いずれの構造も、PAD3 の二量体構造とは異なっていた。単量体であるのか、または二量体であるとすればどのような複合体構造か、ということがわからずにいた。

そこで、本研究では、PAD1 の高分解能の構造解析を目指すとともに溶液の小角散乱により、溶液中での PAD1 の構造を一義的に決定することを目指した。

2 実験

PAD3 のアイズォイムである PAD1 の大量精製・結晶化・X 線結晶構造解析を行った。昨年度までに最もよい結晶の回折データは、BL-5A で収集され、分解能は 3.7 Å であった[1]。

また、精製した PAD1 (IgG 換算で 2.55 mg/mL) と PAD3 (IgG 換算で 1.95 mg/mL) の X 線小角散乱データを、ビームライン BL10C で測定した。データ検出器として DECTRIS 社製 PILATUS3 2M が用いられ、0.9864 Å の測定波長、2047.98 mm のカメラ長で

実験を行った。露光時間は 5 sec で照射を 40 回繰り返して積算した。元の溶液から希釈して 5 段階の濃度の溶液を作り、それぞれについての小角散乱データを収集した。また、得られたデータは ATSAS (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/download.html>) のソフトウェア群(primus, primusqt, gasbor)を使用した。primus ではバックグラウンドを差引いた散乱曲線、ギニエプロット、濃度データから 0 濃度外挿した散乱曲線を求めた。Primusqt では $P(r)$ 関数を求めた。Gasbor では ab initio モデリング計算を求めた。Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) のソフトウェア用いてモデルの重ね合せを行った。

3 結果および考察

PAD1 の試料は、分解されやすく、精製した試料を素早く結晶化しないと構造解析できるような結晶は生成しない。現在のところ、未だに 3.7 Å 分解能を超える構造解析ができていない。

小角散乱では PAD1 と PAD3 は明らかに異なった様相を呈した。慣性半径 (R_g), 原点散乱強度 ($I(0)/c$)、それらから求められる分子量 M_w の違いと PAD3 の結晶構造解析[2]の結果から PAD1 は単量体で機能していることを示唆している。PAD1 の溶液の構造解析もすでに終了しており (論文準備中)、確かに単量体構造にフィットすることがわかった。つまり、S100A3 に対する基質認識の違いは、PAD3 の二量体構造と PAD1 の単量体構造のような大きな四次構造の違いによって、PAD1 の方が柔軟性に富み自由度を増していると考えることが妥当であろう。分解されやすさはそれを反映しているのかもしれない。

4 まとめ

PAD1, PAD3 はよく似たアイソザイムであるが、四次構造は異なっていたことになる。PAD1 が生体内で単量体で存在するかは不明であるが、解離会合をするような構造変化を伴う分子なのかもしれない。精製での不安定な挙動や分解能が上がらない結晶構造解析の結果から、そのようなことが推測される。

PAD3 の構造も 2.8 Å 分解能で決定できたが、活性部位の電子密度が不明瞭であり、活性部位は柔軟な構造をしていると思われる。それでも S100A3 は Arg51 のみしかシトルリン化しないところを考えると、どのように基質認識をしているかは興味のあるところである。今後は PAD3 と基質 (例えば Arg 誘導体、S100A3 やその部分構造) 複合体の構造解析を目指して、研究を進めて行く。

PAD1 の中程度の分解能の結晶構造解析の結果および溶液楕解析の結果は近いうちに論文として発表したい。

謝辞

本研究は科研費・新学術領域研究「構造細胞生物学」の公募研究 25121704, 23121504 の課題により行うことができました。ここに感謝いたします。

参考文献

- [1] M. Unno, S. Kinjo, K. Kizawa, H. Takahara, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **69**, 1357-1359 (2013).
- [2] M. Unno, K. Kizawa, M. Ishihara, H. Takahara, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **68**, 668-670 (2012).

* unno19@mx.ibaraki.ac.jp