

毛上皮蛋白質群の高分解能構造-機能相関解明 Structure-Function Relationships of Proteins in Hair Cuticle

海野昌喜^{1,2*}, 井手賢司¹, 永井杏奈¹, 舟橋一真³, 堀内彩未³, 木澤謙司⁴, 高原英成^{2,5}

¹茨城大学大学院理工学研究科, 〒316-8511 日立市中成沢 4-12-1

²茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 那珂郡東海村白方 162-1

³茨城大学工学部, 〒316-8511 日立市中成沢 4-12-1

Masaki Unno^{1,2*}, Kenji Ite¹, Anna Nagai¹, Kazumasa Funabashi³, Ami Horiuchi, Kenji Kizawa⁴,
Hidenari Takahara^{2,5}

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

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

³Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

⁴Kao Corporation, Biological Science Research Laboratory, 5-3-28 Kotobuki, Odawara, 250-0002,
Japan

⁵Department of Applied Biological Resource Sciences, Ibaraki University, 3-12-1 Chuo, Ami
Inashiki, 300-393, Japan

1 はじめに

S100A3 蛋白質(S100A3)は、単量体あたり 2 つの EF ハンド型 Ca^{2+} 結合モチーフをもつ S100 蛋白質ファミリーの一つである。S100A3 は、毛髪キューティクル細胞で多量に発現しており、システイン含有量が 10%と S100 蛋白質ファミリーの中で最も高いという特徴を持つ。また、分子内には Arg3, Arg22, Arg51, Arg77 の 4 つのアルギニン残基を有しており、それらが脱イミノ化(シトルリン化)されると、二量体で存在する S100A3 は四量体へ構造変化を起こし、 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} に対する親和性が協同的に上昇する。アルギニンのシトルリン化は peptidylarginine deiminase (PAD) によって触媒される。特にキューティクル細胞内では S100A3 と共同存在するアイソザイム PAD3 によって Arg51 が特異的にシトルリン化を受けている。PAD が Ca^{2+} 依存的酵素であることを考えると、S100A3 のアルギニンのシトルリン化と四量体化に伴う $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合親和性の上昇は、キューティクルの角化過程において重要な反応であることが示唆される。また、S100A3 内の 10 個のシステイン残基の内 4 つは 2 つの分子内ジスルフィド結合を形成し、 Ca^{2+} 親和性を制御していることが示されている。一方で、C 末端に位置する 3 つの自由なシステイン残基は Zn^{2+} 結合部位を形成することが推測されているが、これらは推測の域を出ていない。また、 Ca^{2+} が結合する際に生じる構造変化やそれに伴う Zn^{2+} 親和性上昇機構なども現在は不明のままである。

また、興味深いことに、PAD3 同様に毛包に発現する PAD アイソザイムである PAD1 および PAD2

は、S100A3 の 4 つ全てのアルギニン (Arg3, Arg22, Arg51 および Arg77) をシトルリン化する。我々は、なぜ PAD3 のみが Arg51 を特異的に認識し、シトルリン化するのかということにも興味を持っている。

本研究の目的は、PAD1、PAD2 および PAD3 による基質認識の相違を構造生物学的に解明することとともに、S100A3 の $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 協同的結合機構や四量体化機構を原子レベルで理解することである。そのために、PAD アイソザイムの X 線結晶構造と $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合型 S100A3 四量体の X 線結晶構造解析を目指した。

2 実験

PAD3 の構造解析： 精製は既報の方法に準じた [1]。以前の結晶化方法で得られた結晶は Ca^{2+} ソーキングに対して脆かったため、スクリーニングキットを用いて新たな結晶化条件を探索した。X 線回折実験は茨城県つくば市にある、高エネルギー加速器機構の Photon Factory (PF) のビームライン BL-1A で行った。得られた回折データは HKL2000 を用いて処理し、分子置換法で構造解析を行った。まず、CCP4 の Molrep で初期位相を決定し(初期モデルには当研究室で X 線結晶構造解析を行った野生型 PAD3 を使用した)、refmac5 の rigid body refinement で大まかな位置と配向を決定した。グラフィックプログラムの Coot を用いて電子モデルの修正を行った。また、精密化には Phenix を用いた。モデルの修正は既に結晶構造が報告されている Ca^{2+} 結合型 PAD4 (PDB ID: 1WD9) を参考にして行った。

PAD1 の構造解析： アフィニティークロマトグラフィー精製およびゲル濾過クロマトグラフィー精製によりタンパク質試料を得た。精製したタンパク質を 3.0~3.5mg/ml に濃縮した。ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて PAD1 を結晶化させた。PAD1 結晶は、10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5), 0.2 M CaCl_2 , 15-30% (w/v) PEG3350, 2-20% glycerol の条件 (タンパク質試料：結晶化溶液=5 μL : 5 μL) で再現良く得ることができた[2]。AR-NE3A で X 線回折実験を行った。得られた回折データを HKL 2000 で処理した。その後、グラフィックプログラムである COOT を使ってモデルを修正し、Phenix のプログラム phenix.refine を使って精密化を繰り返した。さらに、X 線小角散乱 (SAXS) による PAD1 および PAD3 の溶液構造解析を行った。得られたデータは、ATSAS のソフトウェア群 (primus, primusqt, gasbor) を用いて計算した。Gasbor は、Chimera を使用して *ab initio* モデリングおよび重ね合わせモデルを計算した。

S100A3 四量体の構造解析： S100A3 の cDNA を pET-41a(+)*Xho* I/*Nde* I 間に挿入したプラスミドを用いて大腸菌 SHuffle T7 株を形質転換し、培養した。精製は HiTrap Q FF, HiTrap Butyl HP, Superdex 75 pg を用いて行った。S100A3 変異体 (R51A, R51Q) のプラスミドは QuikChange II を用いて作製した。変異体の Ca^{2+} 結合親和性の比較は励起波長 295 nm、Trp 蛍光波長 340 nm を用いて行った。結晶化は既報の S100A3 二量体結晶化条件を改良したもの[3]に Ca^{2+} を加えた条件で行い、放射光 X 線回折実験及び結晶構造解析を行った。回折実験は BL-1A で行った。

3 結果および考察

PAD3 に関しては、初めて Ca^{2+} 存在下での結晶化に成功した。BL-1A での回折実験では 2.65 Å 分解能に相当する回折像を得た。この分解能は野生型 PAD3 結晶としては今までで最高分解能となる。構造解析の結果、4 個所に Ca^{2+} の結合を確認できた。既報の Ca^{2+} 結合型 PAD4 構造と比較した。PAD4 では 5 個所に Ca^{2+} が結合しており、1 個所を除き、結合部位の構造はおおむね一致していた。PAD3 と PAD4 では、活性部位と離れた部位の構造は類似していたものの、PAD3 では活性部位の残基がディスオーダーしており構造が一義的に決められなかった。このことから、PAD4 に見られ PAD3 に結合していなかった Ca^{2+} の結合が活性部位を形成するのに重要だと考えられる。

PAD1 結晶は非対称単位中に 2 つの PAD1 分子を含み、構造既知である PAD2 および PAD4 の二量体構造とは大きく異なった構造であった[2]。

SAXS 実験の結果より、PAD 1 の慣性半径 (R_g) および重量平均分子量 (M_w) は、それぞれ 37.3 Å および 74.6 kDa の値を示した。PAD3 の R_g および M_w はそれぞれ 38.4 Å および 147.0 kDa であった。

これらの結果から、PAD1 は溶液中において単量体で存在することを示した。一方、PAD3 は、PAD2 および PAD4 と同様の二量体構造であった。PAD2 と PAD3 による S100A3 のアルギニンの認識が異なることから、ただ単に単量体と二量体の違いで基質認識の特異性が決まっているわけではないことが明らかになった。

S100A3 の結晶化は Ca^{2+} を含んだ条件 (0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM CaCl_2) で行った。得られた結晶は Izit Crystal Dye により青く染色されたため、蛋白質由来であることが確認できた。しかし、X 線回折実験にて回折データを得ることができたが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合型 S100A3 の二量体と四量体構造の解明にはいたっていない。結晶化条件に含まれる $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の存在が、 Ca^{2+} の結合を阻害していることを実験的に確かめた。

4 まとめ

本研究課題遂行により、PAD1 の結晶構造と溶液構造を決定できた。PAD1 は単量体で存在することが強く示唆された[4]。

PAD3 の全体構造も決定でき、 Ca^{2+} の結合状態もわかったが、活性部位の一義的な決定には至っておらず、更なる結晶化条件の改良が求められている。

S100A3 については R51Q 変異体が、疑似的にシトルリン化モデルとなり得ることを示した。結晶化条件の改良により、四量体構造を得たいと考えている。

本研究の最終目標である PAD3 と S100A3 複合体の構造解析については、 Ca^{2+} 存在下で安定した結晶化条件を見つけることが、本研究を成功に導く鍵であると考えている。

謝辞

高エネ研の西條慎也助教、清水伸隆准教授には、SAXS の実験や溶液構造解析で大変お世話になった。また、金沢医科大学の和田俊樹助教には、PAD1 の変異体の作製でご協力いただいた。この場を借りて感謝した。

この研究は科研費・新学術領域 (構造細胞生物学) の公募研究 23121504 および 25121704 の一部で行われたものである。また、創薬プラットフォーム 1228 のサポートも受けた。

参考文献

- [1] M. Unno, et al., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **68**, 668 (2012).
- [2] M. Unno, et al., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **69**, 1357 (2013).
- [3] M. Unno, et al., *J. Mol. Biol.* **408**, 477 (2011)
- [4] S. Saijo, et al., *J. Mol. Biol.* **428**, 3058 (2016)

*masaki.unno.19@vc.ibaraki.ac.jp