

# 毛髪キューティクル形成に働く PAD3 の様々な状態の構造と選択的阻害剤 Structures of Several States of PAD3 of Hair Cuticle Formation and Its Selective Inhibitors

舟橋一真<sup>1</sup>, 澤田瑞季<sup>1</sup>, 秋元恵<sup>1,2</sup>, 眞下隆太朗<sup>1,2</sup>, 海野昌喜<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>茨城大学大学院理工学研究科, 16-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

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

Kazumasa FUNABASHI<sup>1</sup>, Mizuki SAWATA<sup>1</sup>, Megumi AKIMOTO<sup>1,2</sup>, Mashimo RYUTARO<sup>1,2</sup>,  
and Masaki UNNO<sup>2</sup>

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

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

タンパク質脱イミノ化酵素 (peptidylarginine deiminase; PAD) III 型アイソザイム (PAD3) は、Ca<sup>2+</sup>依存的にタンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する反応を触媒する PAD 酵素ファミリーに属する。PAD3 は、表皮や毛包のケラチノサイトに発現し、S100A3、トリコヒアリン、フィラグリンなどを主な基質としている。筆者らは、PAD 阻害剤 Cl-amidine との複合体を含む 6 つの状態の PAD3 の X 線結晶構造を決定した。この構造解析により、PAD3-Ca<sup>2+</sup>-Cl-amidine 複合体の Gly374 の周辺に大きな空間があることが確認され、この空間を利用することで新規 PAD3 選択的阻害剤を開発できる可能性があることがわかった。また、PAD4 と S100A3 との *in vitro* での反応性の検討から、PAD3 と PAD4 の類似性が見出された。PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 の構造を比較すると、活性部位周辺の構造の柔軟性が、これらの PAD アイソザイム間で異なる基質選択性をもたらしている可能性が示唆された。

## 1 はじめに

タンパク質脱イミノ化酵素 (peptidylarginine deiminase; PAD, EC 3.5.3.15) は、タンパク質中のアルギニンをシトルリン残基に変換する酵素である。この反応は、シトルリン化または脱イオン化と呼ばれ、Ca<sup>2+</sup>によって制御される不可逆的なプロセスである。この翻訳後修飾によってアルギニンの正電荷が失われるため、分子内および分子間の相互作用ひいてはタンパク質の機能が変化する。

哺乳類では 5 種類の PAD が同定されており、細胞種に依存した発現パターンを示す。PAD1 は表皮と子宮に、PAD2 は脳と筋肉を含むいくつかの組織に、PAD3 は毛包に、PAD4 は顆粒球、単球、マクロファージに、PAD6 は卵母細胞と胚発生時に最も多く発現する。しかし、PAD6 は触媒活性が検出できておらず擬似酵素だと考えられている。シトルリン化を受けたミエリン塩基性タンパク質、ケラチン、ヒストンなどが自己抗原として知られていることから、PAD 酵素ファミリーは生理的に重要なタンパク質である。タンパク質のシトルリン化は、関節リウマチをはじめ、狼瘡、アルツハイマー病、プリオン病、様々な癌などいくつかの疾患と関連している。関節リウマチの場合、患者の約 70% はシトルリン化タンパク質に対する自己抗体を有する。PAD2 と PAD4 は RA と関連することが知られており、両アイソザイムとシトルリン化タンパク質の高い発現が関節リ

ウマチ患者の血中に認められる。また、PAD2 と PAD4 によるミエリン塩基性タンパク質の過剰シトルリン化は、ミエリン鞘の分解、シグナル伝達の遅延、ひいては多発性硬化症に関連していると言われている。さらに、PAD1 は乳ガンで過剰発現している。

PAD3 は、PAD の中でも合成基質および天然基質に対して最も高い基質特異性を示すことから、特に興味深いアイソザイムである。また、PAD3 はアポトーシス誘導因子 (AIF) を介した細胞死に影響を与えることで、細胞増殖を調節している。神経幹細胞では、PAD3 を介した AIF のシトルリン化に伴い細胞死が誘導されることから、PAD3 は Ca<sup>2+</sup>依存性細胞死の上流制御因子として働くと考えられている。さらに、PAD3 は内根鞘や髄質に豊富に存在するアルギニンに富む構造タンパク質であるトリコヒアリンをシトルリン化することから、毛包形成に重要な役割を担っている。また、我々は、2 つの EF-ハンドモチーフを持ち Ca<sup>2+</sup>を結合する S100A3 が、毛包において、PAD3 の基質であることを明らかにした。S100A3 は通常二量体として存在し、各サブユニットに 4 つのアルギニン残基を含んでいる。PAD3 は、S100A3 の他の 3 つのアルギニンよりも Arg51 を選択的にシトルリン化する。この基質選択性は、同じく毛包に発現している PAD1 や PAD2 が、S100A3 の 4 つのアルギニン残基すべてをシトルリン化する

こととは異なるものである。興味深いことに、Arg51 がシトルリン化されると S100A3 はホモ四量体を形成し、Ca<sup>2+</sup>および Zn<sup>2+</sup>結合親和性が協同的に上がる。しかし、S100A3 の Arg51 は近傍の分子内ジスルフィド結合によって保護されており、PAD3 がどのようにしてこの特定のアルギニン残基を認識しシトルリン化するのかは未だ不明である。

PAD3 は上記のような生理的過程にも関与していることから、PAD3 選択的阻害剤を開発し、PAD3 を含めたこの酵素ファミリーが制御するすべての過程を明らかにするための化学プローブとすることは極めて重要である。このような阻害剤の開発を支援するために、我々は PAD3 の構造を決定することを目的とした。具体的には、リガンドを持たないアポ型 (WT) PAD3、Ca<sup>2+</sup>を結合するホロ型 PAD3、Ca<sup>2+</sup>を結合しているが活性部位を形成しない PAD3 の構造を明らかにした。また、触媒活性のない C646A 変異体のアポおよびホロ状態での構造、さらにホロ PAD3 が Cl-amidine を結合した状態での構造も解析した。得られた知見は、より強力で選択性の高い PAD3 阻害剤の創製に役立つものと思われる。

## 2 実験

実験条件は、データを取得した順に記載している。すべての X 線回折強度データは、-173 °C で収集された。apo WT PAD3 については、以前に報告された手順に従った[1]。apo C646A 変異体結晶の X 線回折強度データは、SPRING-8 のビームライン BL-41XU に設置された Dectris Pilatus 6 M で収集された。Ca<sup>2+</sup>結合型 C646A 変異体結晶の X 線回折強度データは、PF の BL-5A に設置した ADSC Quantum 315r 検出器で収集された。Ca<sup>2+</sup>結合非活性型 WT PAD3 結晶の X 線回折強度データは、PF のビームライン BL-1A に設置された Dectris Pilatus 2M-F で収集した。以上の回折データは、HKL-2000 プログラムを用いて処理した。WT PAD3-Ca<sup>2+</sup>-Cl-amidine 複合体結晶の X 線回折強度データは、PF のビームライン BL-1A に設置された Pilatus 2M-F で収集しました。回折データは XDS で処理した。Ca<sup>2+</sup>結合型 WT PAD3 の X 線回折強度データは、Swiss Light Source (SLS) のビームライン X06AS に設置された Eiger 16 M 検出器で収集された。SLS でのデータ収集は、PF の協力によって、全自動データ収集モードで行われた。

毛包には発現しない PAD4 と S100A3 の反応性を測定するため、1 μg の組換え S100A3 を、10 mM CaCl<sub>2</sub> および 5 mM DTT を含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 20 μL 中で 25 mU の PAD4 酵素と 37 °C にて反応させた。2D-PAGE 上の酸性シフトの平均数に基づいて、S100A3 のシトルリン化率を既報の通り算出した。銀染色で検出した S100A3 スポットの相対強度は、画像解析ソフト (Scion) を用いて測定した。4 回の実験データを平均化し、標準偏差をプロットした。

## 3 結果および考察

PAD3 の二量体構造は PAD2 や PAD4 で報告されているものと類似しており、そのサブユニット構造

は PAD1 を含むすべての PAD アイソザイムで保存されていることが確認された。

他のアイソザイム (PAD1, PAD2, PAD4) の構造解析で報告されているように、PAD3 もリガンドがない状態では活性部位が無秩序であり、Ca<sup>2+</sup>結合によって活性型の構造変化が起こる可能性が示唆された。しかし、今回得られた Ca<sup>2+</sup>が結合した状態は 2 種類あり、一方では基質や阻害剤との結合に適した構造を示す活性部位を形成した「活性型」であり、規則的な活性部位を形成されない「不活性型」のであった。後者の構造は、Ca<sup>2+</sup>濃度が非常に高いため、生体内で生じる構造とは異なる可能性が高い。事実、後者では 1 つの Ca<sup>2+</sup>が誤った位置に結合していた。この Ca<sup>2+</sup>は最後に結合するものと考えられ、活性化の最終スイッチとなっていることが示唆された。

PAD 阻害剤として広く用いられている Cl-amidine は基質結合ポケットに結合したが、PAD3 では Gly374 の周辺に大きな空間があり、PAD4 の対応する Arg374 残基と比較して著しく小さく疎水的だった。PAD2 でも同様の空間が見られたが、PAD2 の活性部位空洞は PAD3 のそれと比べて著しく浅かった。PAD3 特有の空間を埋めるように疎水性官能基を付加することで、高い PAD3 選択性を持つ新規阻害剤を開発できる可能性がある。

毛包に発現していない PAD4 は、in vitro では S100A3 に対する反応性は PAD3 と類似していた。つまり、PAD1 と PAD2 が S100A3 の全てのアルギニン残基をシトルリン化するのにに対し、PAD3 と PAD4 は Arg51 を優先的にシトルリン化した。現段階では、この基質選択性の違いの構造的要因を明確に述べることはできないが、今回の構造解析により、活性部位構造の柔軟性が中心的な役割を担っていることが示唆された。

## 4 まとめ

本研究は、PAD3 の構造に関して世界で初めての詳細な報告になった[2]。阻害剤がこのアイソザイムにどのように結合しうるかについての情報を提供すると同時に、異なるアイソザイム間の構造的相違を示すものである。これらのデータは、新しいアイソザイム選択的な阻害剤の開発に役立つとともに、PAD アイソザイムに関する理解を深めることができると考えられる。

## 謝辞

夏季のデータ収集について、SLS のビームライン関係者 (課題番号 20191094, 20191134) および PF の支援者に感謝いたします。

## 参考文献

- [1] M. Unno *et al.*, *Acta Cryst.* **F68**, 668-70 (2012).
- [2] K. Funabashi *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **708**, 108911 (2021).

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