

毛髪蛋白質 S100A3 の四量体形成

山形大院理工 神保雄次・和泉義信； カネボウ化粧品 木澤謙司・井上敬文

[緒言] S100A3は毛髪キューティクルの接合部に特異的に存在するEFハンド型Ca²⁺結合蛋白質であり、Ca²⁺非存在下では二量体として安定に存在している。最近、修飾酵素 PAD によるアルギニンのシトルリン化、或いは、R51A の点変異を行うと S100A3 が活性化し、Ca²⁺濃度増大に伴い四量体を形成する事、Zn²⁺添加により四量体形成が飛躍的に向上する事が見出された¹⁾。この四量体形成はキューティクルの接着・堅牢化に重要なプロセスであると考えられているが、四量体の構造が不明な為にその詳細も不明である。この四量体は結晶化が困難な為に、その構造決定は溶液学的手法に頼らざるを得ない。本研究は、活性型 S100A3 が溶液中で Ca²⁺濃度依存的に四量体形成する事を小角 X 線散乱実験(SAXS)により確認し、四量体の構造情報を得る事を目的とする。

[実験] シトルリン化 S100A3(Wild), 及び、点変異体(R51A)は遺伝子組換え大腸菌により発現させ、生化学的手法により精製された。各蛋白質溶液には、所定量の CaCl₂ と ZnSO₄ が SAXS 測定直前に添加され、蛋白質からの過剰散乱光強度が酵素回折計(BL-10C, PF, KEK)により決定された。得られたデータは濃度ゼロに外挿され、重量平均分子量 M_w , 粒子散乱関数 $P(k)$ 等が決定された。

[結果と考察] Ca²⁺存在下の Wild と R51A に対する M_w は何れも四量体に期待される値より小さく、溶液中では二量体と四量体が混在している事が示唆された。Fig. 1 には、溶液中に存在する四量体成分のモル分率 x_T が Ca²⁺濃度に対してプロットされている。R51A は Wild よりも低 Ca²⁺濃度から四量体形成が始まり、点変異はシトルリン化よりも S100A3 を高活性化させる事が確認できる。一方、() は Zn²⁺存在下、1 mM CaCl₂ が添加された時の結果である。Zn²⁺は S100A3 の C 末側に結合する事が報告されており、Zn²⁺結合は Ca²⁺の結合定数が飛躍的に増大させ、その結果、四量体形成を促進させる事が示唆される。

Fig.2 には、二量体である apo-R51A の $P(k)_D$: () , 30 mM CaCl₂ 中に存在する二量体と四量体の混合物の $P(k)_Z$: () , 及び、 $P(k)_Z = (1 - \zeta_T)P(k)_D + \zeta_T P(k)_T$ より抽出された四量体成分の $P(k)_T$: () がそれぞれ Kratky プロットされている。ここで、 ζ_T は四量体の z 分率で x_T より容易に計算できる量、 k は散乱ベクトルの絶対値である。図中の実線は回転楕円体モデルに基づく理論計算値で、二量体に対し軸比 $\nu = 0.43$ の扁平楕円体モデル、四量体に対し $\nu = 1.95$ の偏長楕円体モデルで実験結果がほぼ再現できる。四量体に対する ν 値は Wild 体、他の Ca²⁺濃度、Zn²⁺添加時でもほぼ同じで、同一の会合様式を取っている事が示唆される。当日は、これらの情報から四量体の構造モデルが紹介され、四量体のメカニズムについて検討される。

1) K. Kizawa et al. (2007) *J. Biol. Chem.* **283**, 5005

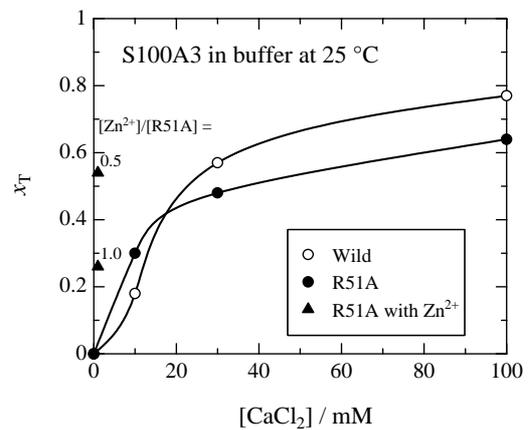


Fig. 1 四量体成分の Ca²⁺濃度依存性

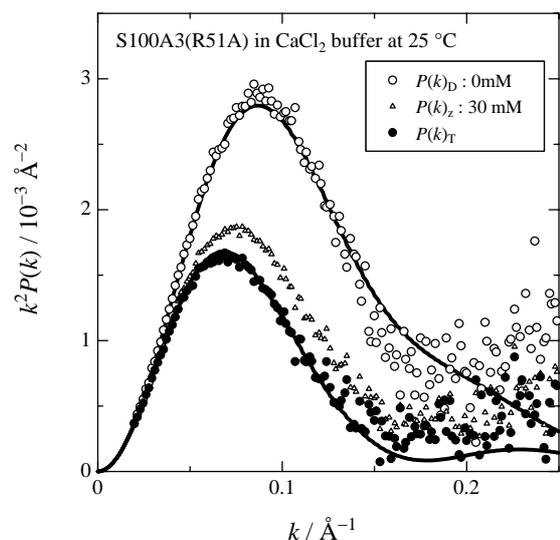


Fig. 2 Kratky プロットで表された R51A の二量体と四量体に対する粒子散乱関数