

機関番号： 34419

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20591358

研究課題名（和文） ヒト毛嚢における S100A3 の脱イミノ化反応の生理的機能とその応用

研究課題名（英文） Physiology and application of deimination of human hair follicle S100A3

研究代表者

川田 暁 (KAWADA AKIRA)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号： 90160986

研究成果の概要（和文）： ヒト S100A3 は毛嚢において生合成された後、同組織に局在する脱イミノ化酵素により EF ハンド領域の構造が変化し、本来の Ca^{2+} 結合蛋白質として機能すること、またその際 4 量体への移行が伴うことが明かとなった。ついで、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合型 S100A3 の結晶解析を行い、今まで報告されていなかったジスルフィド（SS）結合が二か所にあることが分かった。その SS 結合は PAD3 によるシトルリン化と Ca^{2+} 結合に重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要（英文）： S100A3 protein specifically expressed in the cuticular cells of hair follicle. Human S100A3 is characterized by two disulphide bridges, a preformed Zn^{2+} -binding site, and a specific citrullination site by deimination. Conversion to the citrulline residues, symmetrically located on the S100A3 dimer plane - causes the assembly of the Ca^{2+} -bound S100A3 homotetramer. S100A3 acts as a Ca^{2+} buffering protein providing Ca^{2+} ions in turn to the deimination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード： S100A3, 脱イミノ化反応, ヒト毛嚢, peptidylarginine deimase, X線構造解析, カルシウム結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

S100 タンパク質は 1 分子中に 2 種類の E

F ハンド型カルシウム結合ドメインを有し、カルシウムが結合することによりコンフォ

メーション変化を起こし、種々の標的タンパク質と相互作用することで機能を発揮していることが証明もしくは推測されている (J Invest Dermatol. 123: 23-33, 2004)。毛髪キューティクルには、S100A3 が多量に存在するが、本タンパク質がどのようにキューティクル形成に関与するかについての知見は得られていなかった。本研究を開始するきっかけとなったのは、(1) PAD3 は S100A3 に存在する 4 つのアルギニン残基の内 1 残基のみをシトルリン残基に変換する。(2) 同変換により S100A3 は 2 量体から 4 量体に変化する。(3) この 4 量体化の過程で S100A3 のカルシウムに対する親和性が飛躍的に高まる。このような新知見は、S100A3 が不活性型 (前駆型) として生合成され、PAD による修飾を受けることによりその分子機能がダイナミックに変化して活性型 (成熟型) に変化していることが示唆されたことによる。S100 に関する研究発表はこれまで数多くなされているが、S100 の 4 量体化に関する報告はなく、しかも、このような翻訳後修飾による変換機構はこれまで曖昧であった PAD の生理的機能を具体的かつ明瞭にすることを可能とする極めて重要な研究課題であった。

2. 研究の目的

(1) S100A3 は PAD3 によってシトルリン化されると 2 量体から 4 量体に変化すること、またこの 4 量体形成にはカルシウムイオンの存在が不可欠であることが予備的実験で確認されている。本研究ではまずこのような S100A3 のカルシウムイオン依存的な 4 量体への構造変換におけるカルシウム結合能の計量的解析並びに 4 量体形成の可逆性と安定性を明らかにし、その機能を解明する。

(2) S100A3 のシトルリン化に伴う 4 量体化は同タンパク質のさらなる分子成熟化に繋

がる不可欠な生化学反応であると考えられる。次の具体的ステップとして考えられる可能性として、トランスグルタミナーゼ反応による架橋化や細胞内の酸化還元環境の変化に伴うジスルフィド結合の形成などが挙げられる。本研究では、*in vitro* の実験系を用いてこれらを検証する。

(3) S100A3 のシトルリン化に伴う分子構造上の変化を X 線結晶解析並びに溶液中での小角散乱法を用いて解析し、カルシウム結合能の上昇と 4 量体形成の分子メカニズムを解明する

3. 研究の方法

(1) 脱イミノ化 S100A3 の Ca^{2+} 依存的な 4 量体への構造変換における Ca^{2+} 結合能の計量的解析並びに 4 量体形成の可逆性と安定性並びにその機能

ヒト組換え型 PAD による脱イミノ化 S100A3 は、ゲルろ過分離液の Ca^{2+} 濃度や EGTA など調整することで 4 量体と 2 量体が再解離・再会合する。従ってこれらの実験から凡その 4 量体形成に必要な Ca^{2+} 濃度を知ることができるが、より厳密に直接的な手法で結合能を測定することも必要である。本研究では、S100A3 の自己蛍光を指標とした蛍光分光光学法により、脱イミノ化 S100A3 及び同モデル化変異 S100A3 の Ca^{2+} 結合能解析並びに 4 量体化 S100A3 の可逆性や安定性について解析した。

(2) シトルリン化 S100A3 の架橋化形成による重合化

毛髪キューティクルは、皮膚の表皮細胞で形成される強固なコーニファイドエンベロープと類似した A 層と呼ばれるより厚い外層を有している。S100 タンパク質が表皮においてトランスグルタミナーゼによる架橋をうけコーニファイドエンベロープを形成す

るとの報告があることから、S100A3がA層に取り込まれている可能性がある。したがって脱イミノ化 S100A3 が4量体となることがこれらの架橋反応への移行の鍵となっているとの仮説を立て、精製脱イミノ化 S100A3 の重合化について研究する。具体的には、毛髪キューティクルに局在するヒト TGase3 の組換え型酵素を同上 S100A3 と反応させ、その架橋反応→重合化を主に非変性電気泳動法を用いて検討した。

(3) X線結晶解析によるS100A3のシトルリン化に伴う分子構造上変化の解析

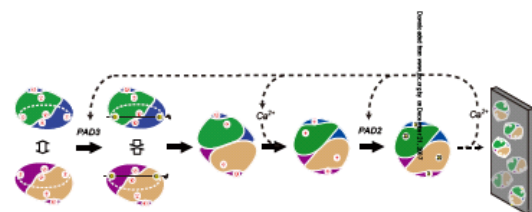
脱イミノ化修飾 S100A3 の高濃度標品を調製し、結晶化並びにX線結晶解析により立体構造解析を行い、すでに報告されている未修飾の S100A3 のそれとの構造比較を行った。結晶化条件の選定は Heizmann らが用いた結晶化条件 (Acta Cryst, D58, 1225-1261, 2002) を用いた。分析として汎用型X線結晶解析装置並びにフotonファクトリー (筑波) を利用申請して実施した。また、溶液中での構造解析が可能な小角散乱法を適用した。

4. 研究成果

(1) 脱イミノ化 S100A3 の Ca²⁺依存的な4量体への構造変換における Ca²⁺結合能の計量的解析並びに4量体形成の可逆性と安定性並びにその機能

S100A3 の自己蛍光 (励起光長 295nm, 発光長 340nm) を指標とした蛍光分光光学法により、酵素的脱イミノ化 S100A3 (R51 が脱イミノ化) 及び同モデル化変異 S100A3 (R3A/R22A/R51A/R77A) の Ca²⁺結合能解析並びに4量体化 S100A3 の可逆性や安定性について解析を行った。その結果、S100A3 は R51 の特異的脱イミノ化により、その Ca²⁺結合能が約4倍高まること ($K_d=13\text{mM}$ から 3.5mM に変化) すること、また安定な4量体化へと移行

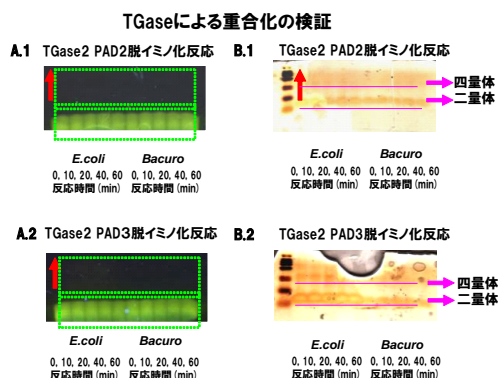
することが明らかとなった。加えて、脱イミノ化を模倣するために作製した Arg 残基変異体のうち R51A もほぼ同様な変化を示すことが判った。このような結果から、S100A3 は毛嚢において生合成された後、同組織に局在する脱イミノ化酵素により R51 が脱イミノ化を受け陽電荷をなくすことにより、EF ハンド領域の構造が変化し、本来の Ca²⁺結合蛋白質として機能すること、またその際4量体への移行が伴うことが明らかとなった。また、高エネルギー加速器研究機構の PF 施設を利用し、放射光小角散乱法による S100A3 の脱イミノ化に伴う分子構造変化の解析についても解析した。その結果、S100A3 が脱イミノ化されることにより、間違いなく分子形状が変化して、四量体化へ移行していることが確認できた。このような知見から、下図に示すように S100A3 は、毛嚢キューティクル細胞内における Ca²⁺要求性 PAD 酵素活性の制御のみならず、Ca²⁺/Zn²⁺ ホメオスタシス制御機構にかかわる重要な機能分子であると推察された。



(2) シトルリン化 S100A3 の架橋化形成による重合化

架橋反応酵素としてヒト組換え型トランスグルタミナーゼ(名古屋大学人見清隆先生から供与を受けた)を用い、架橋反応は S100A3 へのプトレシンの架橋導入による蛍光反応並びに高分子量化を SDS-PAGE を用いて測定した。その結果、非脱イミノ化および脱イミノ化 S100A3 とも顕著な架橋反応を受けることはなかった。従って、S100A3 の脱イミノ化-架橋化が連動して起こることに

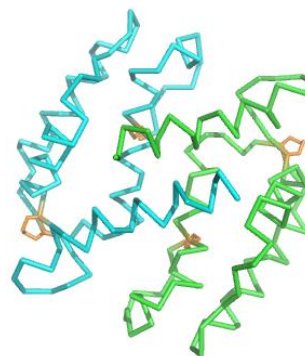
よるキューテイクル組織の硬質化の可能性は低いものと判断された。



(3) X線結晶解析によるS100A3のシトルリン化に伴う分子構造上変化の解析

これまでに多量体構造については報告されていない $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合型 S100A3 の結晶解析を行い、その四量体化機構を原子レベルで明らかにするため、 Ca^{2+} と Zn^{2+} を結合した四量体の結晶化・構造解析を目指した。Arg51をAlaに変異したS100A3はArg51がシトルリン化した分子と類似の性質を示すことがわかっており、我々は Ca^{2+} と Zn^{2+} で S100A3-R51A の結晶化を行った。システインが 10 残基もある S100A3 蛋白質が沈殿しないためには、還元状態を保つことが重要である。しかし、還元剤である DTT と Zn^{2+} は容易に沈殿を形成してしまう。様々な条件検討を行った結果、 Ca^{2+} , Zn^{2+} , DTT 共存化で運よく結晶を得ることができた。しかし、X線結晶構造の結果、得られた構造は二量体構造の金属イオン非結合型であった。その構造を詳細に解析していくと、今まで報告されていなかったジスルフィド (SS) 結合が二か所にあることが分かった。その SS 結合の重要性を調べるため、我々は SS 形成に関与する Cys を Ala に変異した変異体を発現・精製し、CD スペクトル測定、イオン滴定による蛍光測定を行うと共にそれらの変異体と PAD3 酵素との反応解析、さらに結晶構造解析を行った。その結果、二か所の SS 結合は PAD3 によるシトルリン化と Ca^{2+} 結

合に重要な役割を果たしていることが示された。



新しく構造解析した S100A3 タンパク質の全体構造

二量体構造をしており、それぞれの単量体を異なる色 (シアン、黄緑) で示した。オレンジ色が SS 結合を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①K. Kizawa, H. Takahara, H. Troxler, P. Kleinert, U. Mochida, C. W. Heizmann, Specific citrullination causes assembly of a globular S100A3 homotetramer: a putative Ca^{2+} modulator matures human hair cuticle. *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 5004-5013. 査読有

②S. Ying, S. Dong, A. Kawada, T. Kojima, S. Chavanas, M. C. Mechin, V. Adoue, G. Serre, M. Simon, H. Takahara, Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes, *J. Dermatol. Sci.* 53 (2009) 2-9. 査読有

③S. Ying, T. Kojima, A. Kawada, R. Nachat, G. Serre, M. Simon, H. Takahara, An intronic enhancer driven by $\text{NF-}\kappa\text{B}$

contributes to transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase type I gene in human keratinocytes.

J Invest Dermatol. 201 査読有

④M. Unno, T. Kawasaki, H. Takahara, C. W. Heizmann, K. Kizawa, Refined crystal structure of human $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -binding S100A3 protein characterized by two disulphide bridges, J. Mol. Biol. In press. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川田 暁 (KAWADA AKIRA)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：9 0 1 6 0 9 8 6

(2) 研究分担者

高原英成 (TAKAHARA HIDENARI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：3 0 1 2 2 0 6 3