

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06507

研究課題名(和文) 蛋白質脱イミノ化酵素の天然基質高次構造選択的認識/構造機能変換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for recognition of natural substrate and its structure-function alternation by peptidylarginine deiminase

研究代表者

海野 昌喜 (Unno, Masaki)

茨城大学・理工学研究科(工学野)・教授

研究者番号：10359549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質脱イミノ化酵素(PAD)の1つであるPAD3はキューティクル細胞に多量に存在し、共存するS100A3蛋白質のArg51を選択的にシトルリン化する。S100A3はCa<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>存在下でシトルリン化されると、二次構造・三次構造を変化させながら四量体化することに加え、両金属イオンとの結合親和性を上昇させる。これは毛髪角化に重要な生化学プロセスであると考えられる。我々は、本研究課題の実施により、PAD3の立体構造を解明し、他のアイソザイムとの構造の類似点や相違点を明らかにした。また、S100A3のシトルリン化モデルとなる変異体を見出し、その物理化学的性質を明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類のPADには5種類のアイソザイムが存在し、中にはその発現・活性の異常が関節リウマチや多発性硬化症の原因になっているものもある。そのため、PADの選択的阻害剤の開発が望まれてきたが、PAD3の立体構造は今まで詳細に解明されていなかった。また、PAD3によるS100A3の選択的シトルリン化は、他のPADアイソザイムと比較して特殊であり、興味深い。毛髪角化に必要な生化学的プロセスであると考えられている。少子高齢化社会が進行しており、ただ長生きするだけでなく、クオリティオブライフの向上が求められる。S100A3やPAD3の構造・機能の解明は人間の生活の質を向上させることに貢献する。

研究成果の概要(英文)：PAD3, an isozyme of peptidylarginine deiminase (PAD), is abundant in cuticle cells and selectively citrullinates Arg51 of the co-localized S100A3 protein. If Arg51 of S100A3 is citrullinated by PAD3, S100A3 is tetramerized in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> and increases the binding affinity of both Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. This structural and functional changes are considered to be an important biochemical process for hair keratinization. We have elucidated the 3D structures of PAD3 in the several states and clarified their similarities and differences with other isozymes (PAD1, PAD2, and PAD4) by conducting this research project. We also found a mutant of S100A3 that serves as a model for citrullinated S100A3, and succeeded in clarifying its physicochemical properties.

研究分野：構造生物化学

キーワード：シトルリン化 毛髪キューティクル 立体構造 PAD3 S100A3 四次構造変化 カルシウム 金属結合親和性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチ、多発性硬化症等の自己免疫疾患やがんの病因として、タンパク質中のアルギニン残基の脱イミノ化(シトルリン化)の異常が近年明らかになっている (Klareskog et al. 2008 *Annu. Rev. Immunol.*, Harauz and Musse 2007, *Neurochem. Res.*, Kim et al. 2003, *Mol. Cell. Proteomics*, Slack et al. 2011, *Cell Mol. Life Sci.* )。シトルリン残基の存在は、1958年に Rogers らにより毛包中のタンパク質に初めて見出されて以降、ほぼすべての細胞・組織・器官に確認されている (Rogers and Simons, 1958, *Nature* )。この翻訳後修飾は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的酵素 peptidylarginine deiminases (PADs) によって触媒される。哺乳類には 5 種類のアイソザイム (PAD1, 2, 3, 4, 6; PAD4 と PAD5 は同一タンパクであることが判明している。) が存在し、発現部位・生理的役割や関連する病気は多岐にわたっている。ごく最近、PAD3 遺伝子の変異が Uncombable Hair Syndrome (UHS; 櫛でとかせない頭髪症候群) の病因であることも報告されている (Basmanav et al., 2016, *Am. J. Hum. Gen.* )。これらのシトルリン化の詳細なメカニズムは毛包や上皮細胞においても研究が進んでいる。特に、毛包に多量発現している基質 S100A3 タンパク質については、4 つあるアルギニン残基のうち Arg51 のみが選択的にアイソザイム PAD3 によりシトルリン化されると、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  結合親和性が協同的に上昇するとともに、ホモ二量体である S100A3 の EF ハンドモチーフが大きく構造変化しながら四量体に構造変化することが報告され、注目を浴びている (Kizawa et al., 2008, *J. Biol. Chem.* ) (S100A3 の四量体化には、Arg51 のシトルリン化と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の両イオンの結合が必要であり、それぞれのイオンの結合親和性上昇にはもう一方のイオンが必要である。) PAD1 や PAD2 は、PAD3 同様に毛包内に発現し、配列同一性 (identity) が 50% 程度と非常に似たアイソザイムである (Chavanas et al. 2004, *Gene* ) にも関わらず、試験管内で S100A3 の 4 つ全てのアルギニン残基をシトルリン化することから、PAD3 の選択的基質認識が特異であることがわかる。現在、PADs によるシトルリン化の認識アミノ酸配列は明確になっておらず、「立体的」認識機構があるはずである。以上から、本応募研究での「問い」は、次の 2 点である。1. なぜ PAD アイソザイムの中で PAD3 のみが S100A3 の Arg51 のみを選択的に認識でき、どのようにシトルリン化するのか。 2. S100A3 二量体の Arg51 のシトルリン化がなぜ  $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  の結合親和性を上昇させ、どのように四量体化を促進するのか。

## 2. 研究の目的

本研究では、1 つ目の目的として、二量体で分子量が 15 万程度である PAD3 が S100A3 二量体 (分子量約 2 万 4 千) の Arg51 をどのように認識しシトルリン化するかを構造生物学的に解明する。これは、単純な酵素—基質タンパク複合体の構造解析ではない。まず、PAD3 の翻訳後修飾反応には  $\text{Ca}^{2+}$  が必要である。また、両分子ともにホモ二量体であり、PAD3 の分子内対称位置に活性部位が 2 ヶ所、基質 S100A3 の被修飾部位が対称位置に 2 ヶ所あるが、それぞれの距離と位置関係が全く異なることで疑問を大きくしている。今までに小分子基質アナログ (Arita et al. 2004, *Nat. Struct. Biol.* ) や短いペプチド (Arita et al. 2006, *PNAS* ) が結合した (毛包には発現しない) PAD4 の構造は報告されているが、基質タンパクとの複合体構造はどのアイソザイムでも全く解析されておらず、PAD3-S100A3 複合体構造解析は挑戦的課題である。

また、2 つ目の目的として、S100A3 の  $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  結合親和性上昇機構・四量体化機構を原子レベル構造から解明する。 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  が結合し四量体に変換したシトルリン化 S100A3 に関しては、報告者らが解析した X 線小角散乱法による低分解能構造しかなかった (Kizawa, K. et al. 2013,

BBA) S100A3 が EF ハンドモチーフを単量体あたり 2 つ有することやトリプトファン蛍光分析により、Ca<sup>2+</sup>結合時に大きな構造変化があることも推定されており、この四量体化が単なる分子集合でないことは明白である。報告者は S100A3 の Arg51Gln 変異体 (R51Q) がシトルリン化モデルになり得ると考え、その当時、それを独自に実験的に証明していた。この「選択的シトルリン化」と「構造機能変換機構」を原子レベルで解明することができれば、将来的には育毛剤や乾癬の治療薬などに応用できる。

表皮バリア構成タンパク質の研究は技術的に非常に難しいため、毛包や上皮細胞のタンパク質の分子レベルの研究例は少なく、本研究の遂行により、「ヒト上皮系組織の構造生物化学」という報告者独自の領域を創生できる。また、本研究は、S100A3 の構造タンパクとしての生理的役割を明確化していく世界初の例といえる。さらには、毛髪・皮膚の角化の過程を制御している機構に分子・原子レベルで迫る。

### 3. 研究の方法

Ca<sup>2+</sup>を結合した PAD3、阻害剤を結合した PAD3、PAD3 の不活性型変異体 C646A については、すべて X 線結晶構造解析で構造を明らかにした。Ca<sup>2+</sup>結合型については、PAD3 を Ca<sup>2+</sup>存在下で結晶化する方法と、PAD3 単独で結晶化させ Ca<sup>2+</sup>含有溶液にソーキングする方法の 2 通りの方法で作成した。

また、S100A3 については、その変異体を大腸菌発現系により作製し、シトルリン化モデルの溶液構造を、動的光散乱 (DLS) と、X 線小角散乱 (SAXS) により分析した。対象として構想した R51 変異体は、電荷を持たないアラニンに置換した R51A、反応性に富んだチオール基を持つシステインに置換した R51C、負電荷を持つグルタミン酸に置換した R51E、正電荷を持つリジンに置換した R51K、疎水性であるロイシンに置換した R51L、シトルリンに構造が類似したグルタミンに置換した R51Q の 6 種類である。それらの Ca<sup>2+</sup>結合親和性は、トリプトファン蛍光分析により測定した。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析により、同濃度の Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>存在下における見掛けの多量体化状態を測定した。さらに、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の存在による分子外径の変化を、DLS で測定した。さらに、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の存在下・非存在条件下における R51Q と WT の各溶液構造を、SAXS により分析した。

### 4. 研究成果

本研究期間で実施した PAD3 の X 線結晶構造解析の結果、200 mM を超える CaCl<sub>2</sub> を含む結晶化条件の確立に成功し、分解能 2.75 Å で X 線結晶構造解析に成功した。この構造解析からは Ca<sup>2+</sup>に相当する電子密度をそれぞれ 5 ヶ所確認することが出来た。しかし、活性部位の構造を確認出来なかったため結晶化の条件を新たに探索することとなった。非常に多くの条件探索の結果、CaCl<sub>2</sub> や PAD 阻害剤である Cl-amidine 含有溶液へのソーキングにも耐えられる結晶が得られ、この条件をもとに CaCl<sub>2</sub> や CaCl<sub>2</sub> を Cl-amidine 含有する溶液にソーキングを行った結晶で、それぞれ分解能 3.10 Å, 3.18 Å の X 線回折強度データを得ることが出来た。阻害剤含有溶液にソーキングした結晶の回折データの解析を行ったところ、余剰電子密度マップから阻害剤 Cl-amidine (図 1) と 5 つの Ca<sup>2+</sup>の電子密度が確認できた。結晶構造が既知であり、PAD3 と構造類似性がある PAD4-阻害剤複合体構造との比較により、活性部位

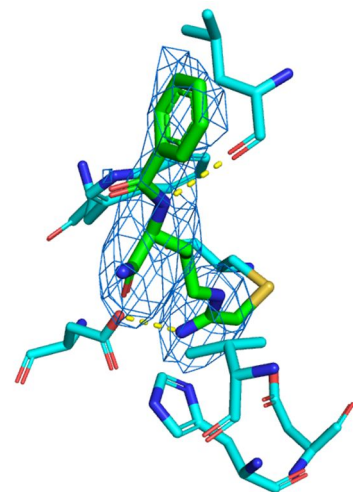


図 1. 阻害剤 (Cl-amidine) と活性部位の構造

構造の内部は構造が類似しているが、活性部位入口近傍に一部アミノ酸残基が保存されていない部位があることを発見した。また、他のアイソザイムの基質結合部位の構造や大きさ・電荷について比較することで、PAD3 選択的阻害剤設計に新たな洞察を与えた。

S100A3 については、まず初めにシステインリッチな S100A3 に適した新たな大腸菌発現系を構築することで、試料調製を効率かつ経済的に改善することができた。Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合型構造の解明には、シトルリン化した S100A3 が必要であったが、毛髪から抽出してくることは倫理的に難しく、また、遺伝子組換え体をシトルリン化する調製法については、酵素的なシトルリン化は厳密に制御することが難しいため、均質な試料を調製することができないことから、一般的に均質で高純度な蛋白質試料を大量に必要とする構造生物学的研究に用いることは、適していなかった。本研究では、S100A3 の Arg51 を PAD3 により酵素的にシトルリン化した試料 (R51Z とよぶ) を調製し、さらに Arg51 を様々なアミノ酸に置換した変異体を作製した。精製することができた変異体のうち R51Q が最も収量が多く、生化学的・生物物理学的性質も R51Z に最も類似していた。これらの結果から、PAD3 で翻訳後修飾された S100A3 のモデルとして、R51Q が適した変異体であると結論付けた。これは、PAD によりシトルリン化したミエリン塩基性蛋白質のモデルとして、アルギニン残基をグルタミンに変換させていた過去に報告されているものと一致していた。

Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の存在より、野生型 (WT) S100A3 は凝集または沈殿してしまう傾向が見られたが、R51Q や R51Z は、凝集や沈殿を起こしにくかった。この結果は、S100A3 のシトルリン化が Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合型構造の安定化に必須であることを示唆した。また、R51Q や R51Z では、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の結合親和性が飛躍的に上昇し、Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>依存的に四量体になることから、S100A3 のシトルリン化は Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の結合を効率かつ安定的なものにする役割を持っていることが推定された。また、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の間にある結合親和性の違いは、毛髪キューティクル細胞内の Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>イオン恒常性において制御に重要な因子であることが示唆され、S100A3 が PAD などの Ca<sup>2+</sup>依存的な酵素の制御に関わっている可能性を示した。

Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>が非存在下では、R51Q と WT S100A3 の構造はほとんど変化しないことが分かった。一方、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の存在下では、R51Q と WT S100A3 の溶液構造の間に大きな違いが観測された。WT S100A3 溶液構造は、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>が存在していない条件のものほとんど変化していなかった。R51Q の溶液構造には、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の有無によって明らかな違いが見られ、両イオンが存在する条件では、分子概形が大きくなっており、大きな構造変化を引き起こすことを示した。しかし、Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合型構造をモデル化することはできず、Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の条件下において、シトルリン化した S100A3 は完全に多量体化するわけではなく、いくつかの会合状態の成分が混在しているためであることが示唆された。そのため、この研究のさらなる発展には、Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合型 S100A3 の会合状態が均一になる条件を検討していく必要がある。

これらの成果は、毛髪キューティクルの成熟化や金属イオン恒常性の解明の足掛かりになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazumasa Funabashi, Mizuki Sawata, Anna Nagai, Megumi Akimoto, Ryutaro Mashimo, Hidenari Takahara, Kenji Kizawa, Paul R Thompson, Kenji Ite, Kenichi Kitanishi, Masaki Unno	4. 巻 708
2. 論文標題 Structures of human peptidylarginine deiminase type III provide insights into substrate recognition and inhibitor design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ite, K., Yonezawa, K., Kitanishi, K., Shimizu, N., Unno, M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Optimal Mutant Model of Human S100A3 Protein Citrullinated at Arg51 by Peptidylarginine Deiminase Type III and Its Solution Structural Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 4032-4042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.9b03618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mizuki Sawata, Kazuma Funabashi, Tetsuya Ohwada, Hidenari Takahara, Masaki Unno
2. 発表標題 タンパク質脱イミノ化酵素PAD3の構造機能相関解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田瑞季、舟橋一真、高原英成、海野昌喜
2. 発表標題 蛋白質脱イミノ化酵素 PAD3 の構造機能相関解明
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手賢司、米澤健人、木澤謙司、北西健一、清水伸隆、海野昌喜
2. 発表標題 ヒト S100A3 蛋白質のシトルリン化モデルの溶液構造特性
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手 賢司, 木澤 謙司, 北西 健一, 海野 昌喜
2. 発表標題 Exploring the posttranslational modification of human S100A3 using citrullination mimics
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手賢司、米澤健人、木澤謙司、北西健一、清水伸隆、海野昌喜
2. 発表標題 S100A3蛋白質のシトルリン化に伴う構造変換機構についての研究
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>海野昌喜研究室HP  <a href="http://unno19.quantum.ibaraki.ac.jp/mysite1/index.html">http://unno19.quantum.ibaraki.ac.jp/mysite1/index.html</a>            茨城大学研究者総覧  <a href="https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/19/0001860/profile.html?lang=ja&amp;#meeting_achievement">https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/19/0001860/profile.html?lang=ja&amp;#meeting_achievement</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------