

報道関係各位

 2021年5月14日
 茨城大学

【プレスリリース】

毛髪キューティクル形成時に働く酵素の詳細な構造を解明 艶と張りのある美しいキューティクルの形成機構解明や薬剤・美容製品の開発に期待

髪のとやハリを左右する「キューティクル」（髪の毛1本を構成する一番外側の層）。その形成に関わる重要な酵素 PAD3 の詳しい構造や性質を、茨城大学大学院理工学研究科（工学野）の海野昌喜教授らの研究グループ（量子線科学専攻博士前期課程2年澤田瑞季さん、修了生舟橋一真さんら）が解明しました。今後、髪の毛がハリガネのようになってしまう病気の治療薬や新しい美容製品・育毛剤などの開発につながることを期待されます。

この成果は、Archives of Biochemistry and Biophysics に2021年5月7日付けで掲載されました。

■背景

毛髪は私たちの体を保護するための重要な器官の一つです。多層構造をしている1本の毛髪の最外層となる「キューティクル」は、S100A3 タンパク質と呼ばれるタンパク質を豊富に有しています。このタンパク質に含まれている、DNA にコードされていない「シトルリン」¹⁾ という特殊なアミノ酸は、S100A3 タンパク質の中に元々備わっていたアルギニンというアミノ酸が、PAD3 という酵素によって変換されたものです（図1）。S100A3 のシトルリン化がうまくできないと、健康なキューティクルが形成できません。また、老化とともに毛髪の中のシトルリン化した S100A3 の量が少なくなっていくというような先行研究もあります。「櫛でとかせない毛髪症候群（UHS）」という、髪の毛がハリガネのようになってしまう病気が PAD3 の遺伝子の変異に起因していることも知られています。

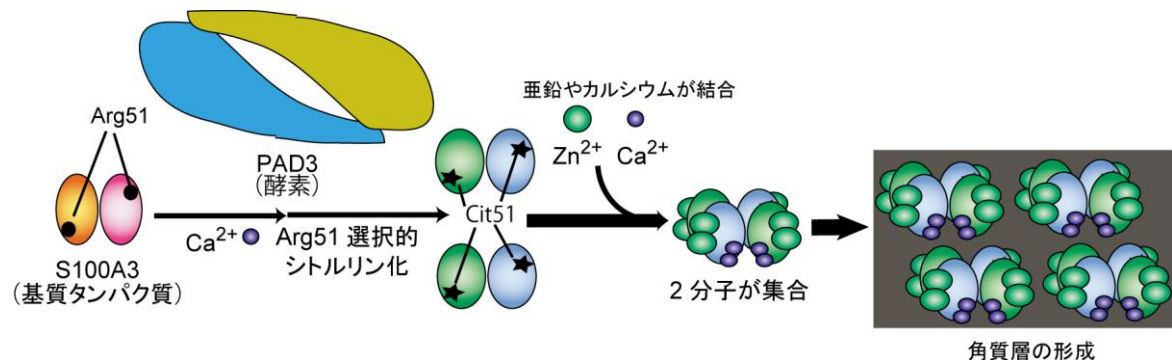


図1. キューティクル細胞内の PAD3 による S100A3 のシトルリン化

シトルリン化した S100A3 は構造と性質が大きく変わる。

タンパク質中のアルギニンをシトルリンに変換する化学反応を促進する酵素は、哺乳類において5つ存在しており、それぞれ PAD1~PAD4、PAD6 と名付けられています（表1）。このうち、毛髪には PAD1~PAD3 の3つが存在していますが、PAD3 は他の類似酵素（PAD1 や PAD2）と異なり、S100A3 タンパク質に4つあるアルギニンのうちの1つを選択的にシトルリン化します。PAD3 によってシトルリン化された S100A3 は、構造と性質が大きく変化することが知られており、それが毛髪の角化と関連します（図1）。

これまで、海野教授のグループが PAD1 の構造を解明した他、先行研究では、PAD2、PAD4 の構造が明らかになっていましたが、毛髪の中で S100A3 に対して特異的に働く特別な PAD3 の構造はわかっておらず、この特別な反応も謎のままでした。

また、PAD1～PAD4 の酵素活性を抑えるような薬（阻害剤）の開発は盛んに行われていますが、PAD3 の詳しい構造がわかれば、PAD1、PAD2、PAD4 との違いをもとに、選択性が高い、すなわちピンポイントで効く、副作用の少ない薬の開発につながります。そのため、PAD3 の立体構造情報が望まれてきました。

表 1. 私達の身体の中にある PAD 酵素（タンパク質中のアルギニンをシトルリン化する酵素）とシトルリン化されるタンパク質、および関連する病気

※当初 PAD5 と名付けられていた酵素は PAD4 と同一であることがわかったので、現在は PAD4 に統一されている

	局在組織	基質 ²⁾	関連する病気
PAD1	表皮, 毛包	フィラグリン, ケラチン	皮膚病 (乾癬, 魚鱗癬様紅皮症)
PAD2	脳・中枢神経 他様々な組織	ミエリン塩基性蛋白 など	多発性硬化症, アルツハイマー病, がん (乳がん, 卵巣がん)
PAD3	表皮, 毛包, 末梢神経系	トリコヒアリン, S100A3	皮膚病(乾癬, 魚鱗癬様紅皮症), UHS
PAD4	単核白血球 マクロファージ	ヒストン (H1, H2A, H3, H4)	リウマチ
PAD6	卵子, 睾丸	不明	不明

■研究手法・成果

本研究グループではまず、ヒト由来の PAD3 の遺伝子を大腸菌に入れて、目的タンパクであるヒト PAD3 をたくさん取得することに成功しました。PAD3 の性質を利用した様々な操作により PAD3 を精製し、純度を上げ、単結晶を得ました。PAD 酵素はカルシウムによって活性化されることがわかっているため、カルシウム存在下・非存在下などでいくつかの状態の PAD3 の結晶を得た他、PAD3 の活性が無くなる変異を入れた変異体の結晶においても同様にカルシウムの有無の状態を作成しました。PAD3 の状態によって結晶が得られる条件が異なっており、得られた結晶も違った形をしていました。

これらの結晶について、放射光施設（兵庫県にある SPring-8 やつくば市にあるフォトンファクトリー）を使った X 線結晶構造解析を行い、活性型・不活性型など 6 つの状態の PAD3 の立体構造を高分解能で明らかにしました。

また、類似酵素である PAD4 と S100A3 タンパク質を試験管内で反応させ、二次元電気泳動で分離し、ウェスタンブロッティングでタンパク質中のシトルリンを検出しました。さらに、プロテアーゼ³⁾と HPLC⁴⁾を用いて、シトルリン化した S100A3 のアルギニンがどれかを確定しました。

その結果、PAD3 の構造や性質が、毛髪に存在する PAD1 や PAD2 よりもむしろ、毛髪には存在しない類似酵素である PAD4 とよく似ていることを示しました（図 2）。

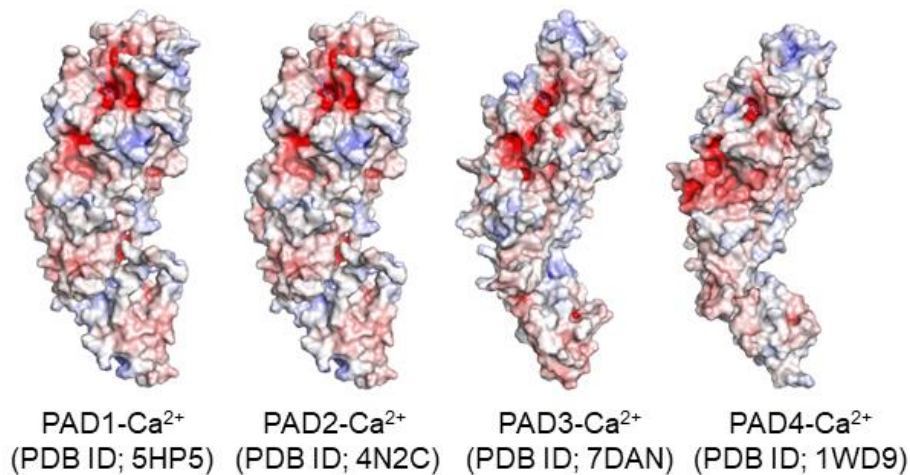


図 2. PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 のサブユニット⁵⁾の全体構造
赤色が負に帯電しているところ青色が正に帯電しているところ。全体構造だけでなく電荷の分布も PAD3 と PAD4 は似ている。

カルシウムを結合すると PAD3 は構造変化を起こし、活性に関わるアミノ酸の配置が完成することを示しました。また、PAD3 の構造中にカルシウムが結合する部位は 5 箇所あり、5 つのカルシウムイオンが順々に結合していくと考えられ、最後にカルシウムが結合する部位についても明らかにすることができました。その最後の 1 つが結合しないと活性型にならないこともわかり (図 3)、これらのことから、カルシウムによってスイッチが入る PAD3 の活性化機構を提唱しました。

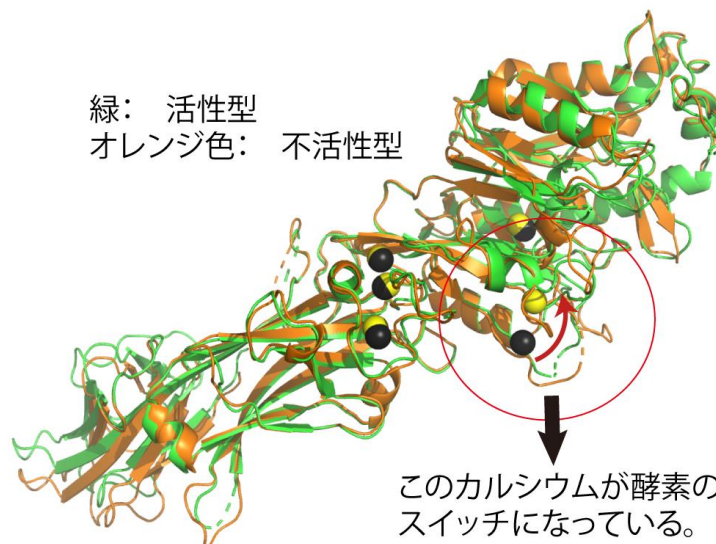


図 3. Ca²⁺を結合した活性型 (緑)、不活性型 (オレンジ色) の PAD3 構造の重ね合わせ
黄色い球、黒い球はそれぞれ活性型と不活性型に結合したカルシウムイオン。赤い丸で囲んだカルシウムが、活性型と不活性型で異なる部位に結合していることが分かった。正しい部位にカルシウムが結合しないと、活性部位のアミノ酸が正しく配置していないことが明らかになり、その構造を不活性型と名付けた。

また、PAD3 の反応を抑える化合物（阻害剤⁶⁾）が結合している構造や不活性な状態の構造も確認し、類似酵素との違いを詳細に明らかにしました。その化合物を結合する部位には PAD3 のみに見られる構造的特徴（空間）があり、この空間をうまく利用することで、PAD3 選択的な薬剤を作ることができる可能性があります（図 4）。

ちなみに、PAD4 は関節リウマチの原因酵素の一つですが、今回の PAD3 の構造解析の成果は、類似する PAD4 の反応を抑えるような PAD4 選択的な化合物を設計する上でも有用な情報になります。

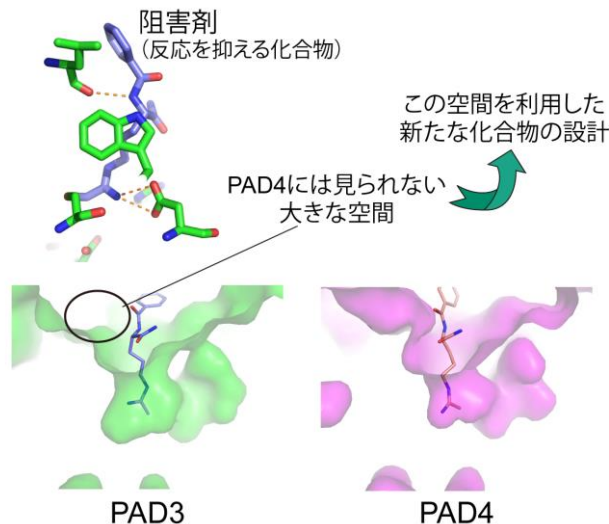


図 4. PAD3 の阻害剤結合部位の構造（左上）と
PAD3, PAD4 の阻害剤結合部位の構造の違い
（左下; PAD3, 右下; PAD4）

PAD3 の阻害剤の結合はゆるやかで、結合部位に、PAD4 には観られない大きな空間があるのがわかる。

■今後の展望

今回の手法や成果は、相互に似た酵素を区別できるような化合物の設計・創製に役立ち、それぞれの PAD 酵素が関連した病気の治療薬などに応用できます。

また、毛髪が角化する機構やキューティクルが形成する機構を解明するとともに、新しい美容製品・育毛剤などの開発を推進し、高齢化社会でも美しさと若々しさを保つクオリティーオブライフの向上にも貢献が期待できます。

一方、現在は PAD3 と S100A3 タンパク質がどのようにお互いを認識して反応が進行するのかがわかっていません。それを明らかにする一つの手段として、PAD3 と S100A3 が結合しているところを直接目で観察することを目指します。それが実現できれば、どのような機構で S100A3 タンパク質がシトルリン化されるのかを明らかにでき、生命の神秘を解き明かすことに近づきます。

■論文情報

タイトル：Structures of human peptidylarginine deiminase type III provide insights into substrate recognition and inhibitor design

著者：Kazumasa Funabashi, Mizuki Sawata, Anna Nagai, Megumi Akimoto, Ryutaro Mashimo, Hidenari Takahara, Kenji Kizawa, Paul R. Thompson, Kenji Ite, Kenichi Kitanishi, *Masaki Unno

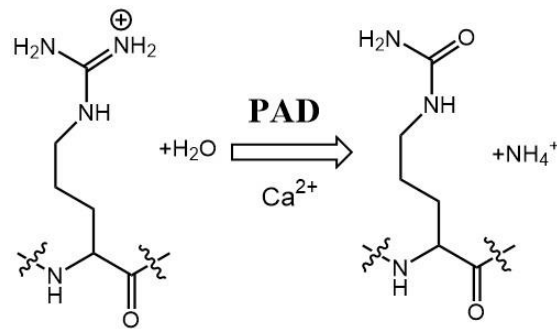
雑誌：Archives of Biochemistry and Biophysics

公開日：2021年5月7日

DOI：10.1016/j.abb.2021.108911

■用語説明

1) シトルリン (化) ……アルギニンが脱イミノ化して生成するアミノ酸で DNA にはコードされていない。タンパク質中のアルギニンのシトルリン化はタンパク質脱イミノ化酵素 (PAD) によって触媒される (下図)。



PAD によるシトルリン化反応

2) 基質……酵素によって化学変化をうける反応物。酵素によって化学変化した基質は「生成物」となって、酵素と離れる。基質がタンパク質である場合もそうでない場合もある。S100A3 は PAD3 の基質であり、特に PAD3 の場合はその配列中の 51 番のアルギニン (Arg51) が選択的にシトルリン化される。

3) プロテアーゼ……タンパク質を分解する酵素

4) HPLC……高効率液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography)。化合物などの物質を構造や分子量やその性質など僅かな違いによって分離する機器あるいは手法のことを指す。

5) サブユニット……タンパク質には複数の構造 (遺伝子からできたもの) が結合して 1 つの機能単位を作るものもある。PAD3 も 2 つが結合して 1 つのタンパクとして働いている。機能するタンパク質を構成する、共有結合でつながっていないタンパク部分をサブユニットと呼ぶ。

6) 阻害剤……酵素に結合して、その酵素活性を低下させたり失くしたりする物質。