

ヒト毛細胞特異的ペプチジルアルギニンデイミナーゼの cDNA クローニングと毛髪新生における生理機能の解析

近畿大学 医学部皮膚科学教室

川 田 暁

Peptidylarginine deiminase (PAD) catalyzes the post-translational modification of proteins through the conversion of arginine to citrulline in the presence of calcium ions.

In rodents, PAD has been classified into four isoforms, types I, II, III, and IV, which are distinct in their molecular weights, substrate specificities, and tissue localization. Of these isoforms, only type III was detected in epidermis and hair follicles. Although the role of this enzyme in these tissues is not yet clear, indirect data have shown that several structural proteins such as filaggrin, trichohyalin, and keratin are substrates for PAD. In this study, we cloned the full-length cDNA of human PAD type III (3,142 bp) from cultured human keratinocytes by the reverse transcription-polymerase chain reaction and by rapid amplification of cDNA ends methods. This cDNA contained a 1,995 bp open reading frame encoding 664 amino acids ($M_r = 74,770$). To explore the physicochemical and enzymatic properties of human PAD type III, we constructed a plasmid for producing a recombinant human PAD type III in bacteria. The enzymatic characteristics of the recombinant enzyme were very similar to those of the rodent PAD type III. Based on the enzyme's activity towards human filaggrin and trichohyalin, it appears that the enzyme prefers catalyzing the modification of arginine residues in filaggrin. These data imply that human PAD type III may function as a modulator of filaggrin in these tissues.

1. 緒 言

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ [英名: Peptidylarginine deiminase, EC 3.5.3.15] (以下 PAD と略記) は、蛋白質の Arg 残基を脱イミノ反応により Ci t 残基に変換する極めてユニークな蛋白質修飾酵素であるが、その生理機能については未だ不明の点が多い。しかし、最近、表皮・毛嚢組織に存在するケラチンならびにケラチン結合蛋白質に Ci t 残基が存在することやこれら蛋白質の脱イミノ化に伴いトランスグルタミナーゼによる分子間架橋反応が著しく促進されることが明らかとなった。これらの知見は、PAD が表皮・毛嚢細胞の角質分化に大変重要な役割を果たすことを示唆している。我々は、以前より表皮・毛嚢組織特異的に発現する PAD (PAD type III) が存在することを見出し、本酵素の上記表皮・毛嚢蛋白質の脱イミノ化への関与を推定している。

我々は、同酵素の生化学的並びに分子生物学的な研究をまずラット・マウスの実験動物から開始し、その cDNA クローニングとその全一次構造を解明した^{1, 2)}。ついで、これらの知見を参考にし、ヒト PAD type III の表皮・毛嚢組織ならびに細胞内局在と分化に伴う発現変化、さらには表皮・毛嚢蛋白質への作用とその機能変化を通じ、本酵素の生理機能を解明を目指すこととした。そのためには、本酵素の cDNA クローニングが不可欠であり、同 cDNA

を用いた大腸菌での大量発現系の構築が極めて重要である。本研究では、ラット・マウスの PAD type III cDNA の塩基配列に基づくホモログ PCR による cDNA クローニングから研究に着手した。これまでに得られた研究成果を項目に分けると、1) ヒト PAD type III の cDNA クローニングとその塩基配列の決定 2) 同 cDNA の大腸菌での発現ベクターの構築と組換え型酵素の精製方法の確立 3) 同組換え型酵素の蛋白質化学的並びに酵素化学的性質の解明である。以下にこれらの成果の内容について紹介する。

2. 実 験

1) ヒト PAD type III の cDNA クローニングとその塩基配列の決定

まず、培養ヒト表皮細胞から poly (A)+mRNA を調製、ランダムプライマー法により一本鎖 cDNA を合成、これを鋳型として PCR を行い、DNA 断片を増幅した。尚、プライマーは N 末端側最上流の相同アミノ鎖配列 (ILLVNCD) と C 末端側最下流配列 (HCGTVRR) からデザインした合成 DNA を用いた。ついで、増幅 DNA を T-plasmid にクローニングし、得られたクローンの塩基配列分析を行った。さらに、未決定の 5' 並びに 3' 領域については RACE 法を用いてクローニングし、得られたクローンの塩基配列分析を行った。以上の実験により同 PADcDNA の全塩基配列を決定した。

2) ヒト PAD type III cDNA の大腸菌での発現ベクターの構築と組換え型酵素の精製

本 cDNA を大腸菌で発現させるために用いた発現ベクターは、先に報告した独立型 Two-Cistron 発現ベクター³⁾を用いた。翻訳領域にフレームが合うよう制限酵素サイトを付与したプライマーを合成後、上記 cDNA を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅、配列を確認後、制限酵素



Molecular cloning of human hair follicle specific peptidylarginine deiminase cDNA and its function of hair regeneration

Akira Kawada

Department of Dermatology, Kinki University School of Medicine

した。本酵素は SDS-PAGE で算出される分子量が 66.0kDa であり、アミノ酸配列からの推定分子量 74.77kDa と大きな隔たりがあった。これに関して質量分析計を用いて詳しく分析を行った結果、本酵素の分子量はアミノ酸配列からの推定分子量と一致することが確認された。

本酵素が SDS-PAGE で示す挙動については今後の研究

課題である。Table 1 は、各種のアルギニン誘導体に対する本酵素の反応性を比較したものである。本酵素は benzoyl-arginine-ethylester, benzoyl-arginine-amide には高い活性を示し、また天然のモデル基質であるプロタミンには特に強い活性を示すことが判った。これらの性質は、マウスの野生型 PAD type III と共通した性質⁴⁾であり、本組換え型酵素が野生型酵素と大きな性質の変化が生じて

Table 1 Substrate specificities of the recombinant human PAD type III towards various arginine derivatives.

Substrate ^a	Recombinant Type III		Native Type III ^b
	mol/min/mg	Relative activity (%) ^c	Relative activity (%) ^c
Bz-L-Arg-O-Et	1.96	100.0	100.0
Bz-L-Arg-O-Me	1.13	57.6	26.8
Bz-L-Arg-O-NH ₂	1.43	73.1	88.4
Tos-L-Arg-O-Me	0.36	18.2	27.4
Ac-L-Arg-O-Me	0.52	26.5	32.1
Bz-L-Arg O.39	19.7	11.6	
Ac-L-Arg O.14	7.2	11.6	
L-Arg-O-Me	0.11	5.7	15.3
L-Arg	0.08	4.2	8.9
Protamine	4.28	218.6	141.1

^a Concentration of each arginine derivatives were 10 mM and that of protamine was 4mg/ml.

^b Terakawa et al,⁴⁾

^c Relative activity was calculated on the basis of the activity towards Bz-L-Arg-O-Et.

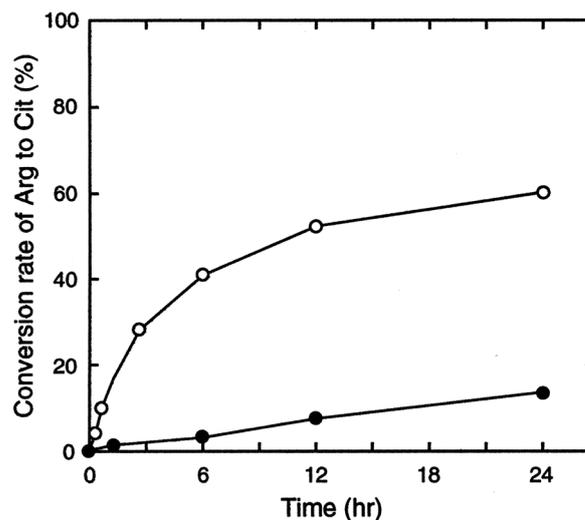


Figure 2 Time course of deimination of filaggrin unit and trichohyalin by human PAD type III. Each protein was deiminated by the enzyme as described in Materials and Methods. At the indicated times, the reaction was terminated by EDTA, and the citrulline residues in each preparations were determined by amino acid analysis. Conversion rate of arginine residues to citrulline residues of each protein (○ -, filaggrin unit; ● -, trichohyalin) was shown.

いないことが確認された。ついで、本酵素のフィラグリン及びトリコヒアリンに対する反応性について解析した。Figure 2 は本酵素と各蛋白質を 1 対 50 のモル比で反応させた時の結果である。本酵素はフィラグリンの Arg 残基を最大 60% 修飾して Cit 残基に変換するに対し、トリコヒアリンでは 13% 程度であり、本酵素がフィラグリンを効果的に修飾することが明らかとなった。

4. 考 察

本研究では、ヒトの表皮培養細胞から mRNA を得て、ホモログ PCR より PAD type III の cDNA のクローニングに成功した。今回得た cDNA が実際にヒト PAD type III をコードするものであることは、本 cDNA から推定されるアミノ酸配列がすでに明らかとなっているラット、マウスのそれらと極めて高い相同性を有すること、また、実際に本 cDNA を大腸菌で発現させた酵素の基質特異性は天然の PAD type III と変わらないことから判断できる。本酵素のアミノ酸配列の特徴として N 末端領域に Cys 残基が多く存在していることが挙げられる。今回の研究により、本酵素は低イオン強度化においても高い安定性を有していることが判ったが、本酵素のこのような安定性は、本酵素が常に外的刺激に晒される細胞表層において機能するために必要であり、そのための強固な立体構造の維持に N 末端領域の多数の Cys 残基が必要となっているのではないかと推測される。PAD type III が表皮・毛嚢組織においてどのような蛋白質を標的としていることを明らかにすることは、本酵素の生理機能の解明のうえで大変重要である。本研究において、PAD type III の標的蛋白質として推定されているフィラグリン及びトリコヒアリンに対する反応性を調べた結果、フィラグリンに対する反応性がトリコヒアリンに比べ迅速に且つ多くの Arg 残基を修飾することが判った。このような結果は、トリコヒアリンが本酵素の標的蛋白質である可能性が低いことを示唆するものである。

最近、リュウマチ性慢性関節炎の患者の血中には Cit 化されたフィラグリンのみを認識する自己抗体が含まれることが報告され⁵⁾、慢性関節炎の発症と Cit 化フィラグリンの免疫感作の成立との間の相関性に興味を持たれている。本研究により PAD type III がフィラグリンを標的蛋白質としている可能性が高くなったことから、本酵素遺伝子の発現制御機構に関する基礎的研究が今後大変重要であると思われる。

(文 献)

1. Nishijyo T, Kawada A, Kanno T, Shiraiwa M, Takahara H: Isolation and molecular cloning of epidermal- and hair follicle- specific peptidylarginine deiminase (type III) from rat, *J. Biochem.*, 868-875, 1997.
2. Rus'd AA, Ikejiri Y, Ono H, Yonekawa T, Shiraiwa M, Kawada A, Takahara H: Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse, *Eur. J. Biochem.*, 259, 660-669, 1999.
3. Ohsugi I, Takahara H, Shiraiwa M, Sugawara K: Expression of mouse uterine peptidylarginine deiminase in *Escherichia coli*: construction of expression plasmid and properties of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 317, 62-68, 1995.
4. Terakawa H, Takahara H, Sugawara K: Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution, *J. Biochem.*, 110, 661-666, 1991.
5. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, et al: The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues, *J. Immunol.*, 162, 585-594, 1999.