

最近の研究から

ヒストン修飾酵素 Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) の活性化とヒストン認識

有田恭平, 清水敏之, 橋本 博, 佐藤 衛

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

Structural basis for Ca²⁺-induced activation of peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and histone N-terminal recognition

Kyouhei ARITA, Toshiyuki SHIMIZU, Hiroshi HASHIMOTO, Mamoru SATO

International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University

1. はじめに

真核生物の DNA は、ヒストン八量体 [四種類のヒストン H2A, H2B, H3, H4 が (H2A-H2B)₂(H3)₂(H4)₂ の八量体を形成: H はヒストンの頭文字] に巻きついて、ヌクレオソームを形成している。個々のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) の N 末端領域は決まった立体構造をとらないでヒストン八量体から突き出ているので、アセチル化, リン酸化, ユビキチン化, メチル化などの共有結合性の修飾 (翻訳後修飾) を受ける。このようなヒストンの N 末端領域の翻訳後修飾は、ヌクレオソームがらせん状に並んだクロマチン (染色体) の構造をダイナミックに変化させて遺伝子の発現を調節しているが、最近、ヒストンのシトルリン化が新規の翻訳後修飾として注目されるようになった。

ヒストンのシトルリン化は、Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) によって Ca²⁺ 依存的にアルギニン残基が脱イミノ化されて起こる (Fig. 1)。PAD はこれまでに 5 種類のアイソフォーム (PAD1-4, PAD6) が同定されているが、その中で唯一 PAD4 のみが核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を有して細胞の核内に存在し、ヒストンのシトルリン化に関与している [1]。PAD によるタンパク質のシトルリン化はアルギニン残基の正電荷を消失させるので、ターゲットとなるタンパク質の高次構造や他の分子との相互作用が変化し、細胞内の様々な機能に大きな影響を及ぼす [2]。

PAD4 によるヒストンのシトルリン化はメチル化と拮抗して遺伝子発現を調節している (Fig. 1)[3, 4]。事実、ヒストン H3 の Arg17 と H4 の Arg3 はそれぞれ CARM1 (cofactor associated arginine methyltransferase 1) と PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) によってジメチル化されるが、これらの部位がメチル化されるとエストロゲンレセプターを介した転写が活性化される [5, 6]。一方で、PAD4 はヒストン H3 の Arg2, Arg8, Arg17, Arg26 および H4 の Arg3 をシトルリン化するが、ヒストン H3 の Arg17 とヒストン H4 の Arg3 がシトルリン化されると CARM1 と PRMT1 によるメチル化が阻害される。また、興味あることに、CARM1 と PRMT1 によるアルギニン残基のジメチル化はモノメチル化を経て起こるが、PAD4 はこのモノメチル化されたア

ルギニン残基もシトルリン化し、結果的にモノメチル化されたアルギニン残基を脱メチル化する (Fig. 1)[3, 4]。ヒストンのメチル化は他の翻訳後修飾に比べて安定で、これまでヒストンの脱メチル化反応を触媒する酵素は見つかっていなかったが、モノメチル化されたアルギニン残基をシトルリン化することが示されたことによって、PAD4 はヒストンの脱メチル化に関与する初めての酵素としても注目されるようになった。

一方、タンパク質のシトルリン化は関節リウマチとも深く関連している。関節リウマチは遺伝的・環境的な要因によって骨と骨をつなぐ関節にある滑膜で炎症が生じ、骨や軟骨の破壊を起こす難治性の自己免疫疾患である。PAD と関節リウマチとの関連では、

- 1) ヒト全ゲノムを対象にした関節リウマチ関連遺伝子の大规模ケースコントロール関連解析から、PAD4 遺伝子上に関節リウマチ感受性の一塩基多型が見つかった [7]。
- 2) PAD および PAD によってシトルリン化されたタンパク質が関節リウマチの患部である滑膜に局在している。
- 3) 関節リウマチの発症に関与する主要組織適合系複合体 [MHC II (HLA-DRB1*0401)] はシトルリン化ペプチドと高い親和性を示す。
- 4) 関節リウマチの患者は関節リウマチに特異的な自己抗体を産生しているが、いずれの自己抗体も PAD によってシトルリン化されたタンパク質を非自己 (自己抗原) として認識して産生されている [8]。

ことから、PAD4 が関節リウマチの原因タンパク質であることが示され、PAD4 の活性阻害剤は慢性関節リウマチの根本的な治療薬になるものと期待されている。

以上のように、PAD4 の構造と機能の関連を明らかにすることはヒストン修飾による転写調節機構の解明や関節リウマチの新規治療薬の開発にきわめて重要である。そこで、本稿では PAD4 の X 線結晶構造解析から明らかにされた新しい酵素の活性化機構 [9] およびヒストン認識について紹介する [10]。

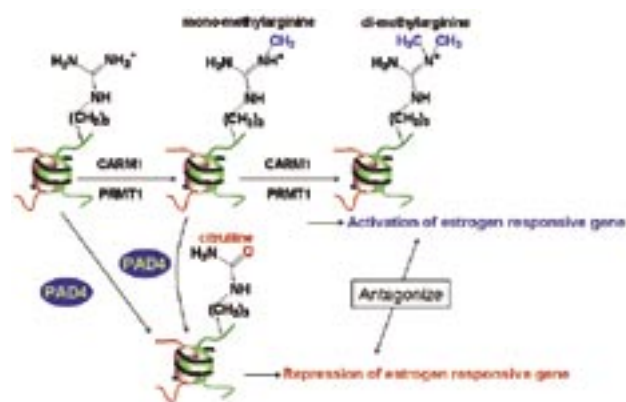


Figure 1
Transcriptional regulation by histone arginine citrullination by PAD4 and methylation by CARM1 and PRMT1.

2. 結晶化とX線結晶構造解析

PAD4は大腸菌の発現系で大量に発現され、アフィニティーカラムおよびイオン交換カラムで高度に精製された。Ca²⁺非結合型PAD4の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行い、0.1 M Imidazole pH 8.0, 0.2 M Li₂SO₄, 8 % PEGMME2000の条件で高分解能のX線結晶構造解析に適した結晶が得られた[11]。構造解析はEMTS (Ethyl mercurithiosalicylate), TMLA (Trimethyl lead acetate),

KAu(CN)₂, K₂PtCl₄, LuCl₃で調製された重原子誘導体結晶を用いたMIRAS法(異常分散を考慮した多重同型置換法)で行った。また、Ca²⁺結合型PAD4とCa²⁺結合型PAD4-基質(benzoyl L-arginine amide: BA)複合体の結晶は、PAD4のC645A不活性変異体の結晶をそれぞれCa²⁺およびCa²⁺と基質BAを含む溶液に浸漬して調製した。なお、PAD4のC645A不活性変異体[Ca²⁺非結合型PAD4(C645A)]の精製および結晶化はCa²⁺非結合型PAD4と同じ条件で行った。

一方、PAD4-ヒストンペプチド複合体の結晶は、Ca²⁺非結合型PAD4(C645A)の結晶をCa²⁺存在下それぞれヒストンH3のArg8を含むペプチド、ヒストンH3のArg17を含むペプチド、及びヒストンH4のArg3を含むペプチドを含む溶液に浸漬して調製した。Table 1に結晶学的データおよび回折強度データと精密化の統計値を示す。

3. 全体構造

Fig. 2aにPAD4の全体構造を示す。PAD4は2つのドメイン[N末端ドメイン(N-terminal domain)とC末端ドメイン(C-terminal domain)]から構成され、その形は細長いブーツ状である。Ca²⁺はCa²⁺結合型PAD4およびCa²⁺結合型PAD4-基質BA複合体の異常分散差フーリエ図から5つ確認され、そのうち3つはN末端ドメインに、残り2

Table 1. Crystallographic data, and data collection and refinement statistics

	Ca ²⁺ -free PAD4	Ca ²⁺ -bound PAD4	BA Complex	Peptide H3-1 Complex	Peptide H3-2 Complex	Peptide H4 Complex
Crystallographic data and data collection statistics						
Space group	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Cell dimensions						
<i>a</i> (Å)	144.6	146.4	146.1	146.3	146.1	146.2
<i>b</i> (Å)	60.4	60.1	60.0	60.8	60.1	60.6
<i>c</i> (Å)	113.4	115.3	115.4	115.1	115.7	115.2
β (°)	123.6	124.4	124.2	124.3	124.3	124.2
Resolution range (Å)	33.42-2.80	50.00-2.60	50.00-2.30	50.00-2.00	50.00-2.07	50.00-2.25
Total observations	93,345	127,227	273,837	233,822	222,220	153,298
Unique reflections	38,041	24,864	36,718	55,675	47,513	39,724
Completeness (%)	97.6 (98.3)	96.2 (96.8)	97.9 (93.5)	97.7 (96.2)	92.6 (63.9)	98.3 (98.2)
<i>R</i> _{merge} (%)	4.6 (26.1)	5.0 (36.1)	5.0 (21.7)	5.6 (39.5)	6.2 (33.3)	6.1 (34.5)
Refinement						
Resolution (Å)	2.80	2.60	2.30	2.10	2.10	2.25
No. reflections	17,603	22,280	32,646	43,126	41,436	35,325
<i>R</i> / <i>R</i> _{free} (%)	23.1 / 26.4	22.4 / 26.9	21.1 / 25.2	20.2 / 24.1	20.2 / 24.6	19.9 / 24.8
No. atoms						
Protein	4,382	4,745	4,951	4,952	4,937	4,943
Substrate	0	0	20	39	40	37
Ca ²⁺	0	5	5	5	5	5
Water	0	64	162	224	191	154
R.m.s. deviations						
Bond lengths (Å)	0.019	0.017	0.014	0.012	0.012	0.012
Bond angles (°)	1.894	1.662	1.595	1.465	1.468	1.622

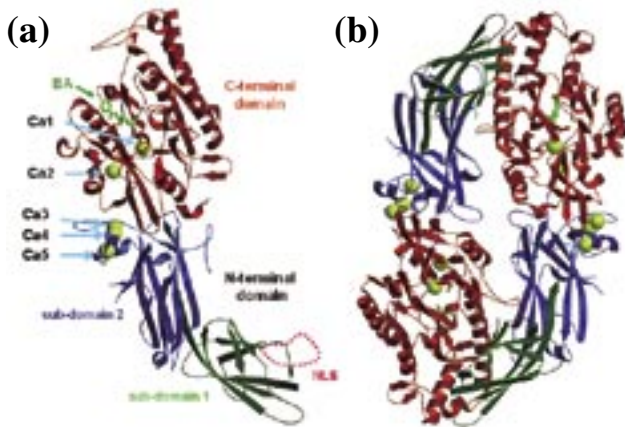


Figure 2

Overall structure of the substrate complex of Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A). (a) Ribbon representation of the monomeric form of the substrate complex. Five Ca^{2+} ions (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, and Ca5) are shown as black balls, and the substrate, benzoyl-L-arginine amide (BA), as a dark blue ball-and-stick model. Sub-domains 1 and 2 and the C-terminal domain are presented in yellow, green, and red, respectively. The putative nuclear localization signal (NLS) region is shown by a dotted line. (b) Ribbon representation of the dimeric form of the substrate complex. A crystallographic 2-fold axis runs vertically at the center of the dimer.

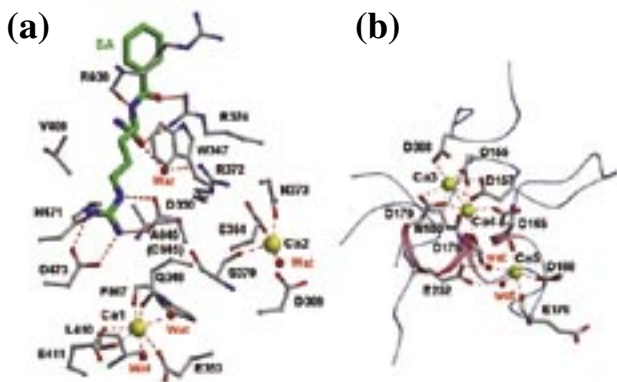


Figure 3

Structures around substrate and Ca^{2+} binding sites in Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A). The substrate, benzoyl-L-arginine amide (BA), is shown as a green stick model. Ca^{2+} ions are shown as yellow balls. (a) Structure around Ca1, Ca2, and the substrate, benzoyl-L-arginine amide, in the C-terminal domain. (b) Structure around Ca3, Ca4, and Ca5 in the N-terminal domain.

つは C 末端ドメインに見出された。これら 5 つの Ca^{2+} はいずれも EF ハンドとは異なるモチーフで結合しており (Fig. 3), 既知の Ca^{2+} 結合タンパク質との比較において興味もたれる。また, 基質 BA の電子密度は C 末端ドメインの 2 つの Ca^{2+} の近傍に確認された。

また, PAD4 はいずれの結晶においても結晶学的な 2 回軸で関連付けられるもう 1 つの分子に近接していた (Fig. 2b)。この 2 分子の分子量はゲルろ過クロマトグラフィー及び動的光散乱の結果とも一致し, また, その形状は X 線小角散乱法によって決定された低分解能溶液構造と一致しているため, PAD4 は結晶中で近接している 2 分子 (2 量体) で機能することが示唆される。

4. N 末端ドメイン

N 末端ドメインは 1-300 番目のアミノ酸から構成されている。このドメインはさらに 2 つのサブドメイン (sub-domain 1 と sub-domain 2) に分けることができる (Fig. 2a)。sub-domain 1 と sub-domain 2 はともに免疫グロブリン様の構造をとり, sub-domain 1 には $^{56}\text{PPAKKKST}^{63}$ という核移行シグナル (NLS) が存在している。この領域は 2 つの β -strands を結ぶ分子表面のループ領域に存在しているが, いずれの結晶においてもこの領域は disorder している。また, 冒頭で述べた関節リウマチ感受性の一塩基多型は G55S, V82A, G112A というアミノ酸置換を引き起こすが, これらのアミノ酸置換部位はすべて sub-domain 1 に局在し, C 末端ドメインに存在する活性部位 (後述) からは遠く離れている。さらに, G55S, V82A, G112A の置換は Ca^{2+} の結合や 2 量体形成にも関与していないので, これらの関節リウマチ感受性の一塩基多型は PAD4 の活性には影響しないものと思われる。

一方, sub-domain 2 の分子表面には 3 つの Ca^{2+} がクラスターを形成して結合している (Fig. 2a)。この領域は Ca^{2+} 非結合型 PAD4 では disorder しているが, Ca^{2+} 結合型 PAD4 および Ca^{2+} 結合型 PAD4-基質複合体では Ca^{2+} が結合することにより安定化され, α -helix 構造が誘起されている (Fig. 3b)。 Ca^{2+} の結合 (配位) には Asp388 と 153 番目から 179 番目の酸性のアミノ酸が関与しているが, Asp155 や Asp157 や Asp176 のように一つのアミノ酸の主鎖と側鎖が複数の Ca^{2+} に配位する様式も認められる。このような Ca^{2+} がクラスターを形成してタンパク質表面に結合する様式は Protein kinase C (PKC) の C2 ドメインにも認められる。PKC の C2 ドメインは Ca^{2+} 結合による表面電荷の変化によってリン脂質との結合が制御されているが, sub-domain 2 の Ca^{2+} クラスターの生理学的な機能はまだよくわかっていない。

5. C 末端ドメイン

301-663 番目のアミノ酸残基からなる C 末端ドメイン (Fig. 2a) は, α/β プロペラ構造と呼ばれる擬似の 5 回軸で関係付けられる 5 つの $\beta\beta\alpha$ module から構成されている (Fig. 4)。 α/β プロペラ構造は, L-アルギニンに L-シトルリンに変換する arginine deiminase (ADI)[12] や L-アルギニンとグリシンから guanidinoacetic acid を合成する arginine:glycine amidinotransferase (AT)[13] などの L-アルギニン修飾酵素において共通に認められる構造である。この α/β プロペラ構造の中心部にはクレフトが形成されていて, 基質 BA と 1 つの Ca^{2+} (Ca1) が結合していた。もう 1 つの Ca^{2+} (Ca2) は 2 番目の $\beta\beta\alpha$ モジュール (modules 2, Fig. 4) の α -helix と β -strand の間に確認された。なお, Ca1 には, Gln349, Glu353, Glu411 の側鎖と Phe407 と Leu410 の主鎖カルボニル酸素と 2 つの水分子が配位し, Ca2 には Glu351, Asp369, Asn373 の側鎖と Ser370 の主鎖カルボニル酸素と 1 個の水分子が配位している (Fig. 3a)。

Fig. 3a に基質 BA 認識の様子を示す。基質 BA のアルギニン側鎖のグアニジノ基の窒素原子は 2 つの酸性残

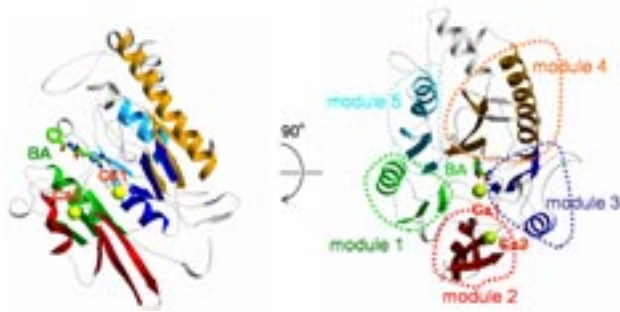


Figure 4
Ribbon representation of the C-terminal domain in the substrate complex of Ca²⁺-bound PAD4 (C645A). Five ββαβ modules 1, 2, 3, 4, and 5 are colored light blue, red, dark blue, yellow, and orange, respectively. The substrate, benzoyl-L-arginine amide (BA), is shown as a green stick model. Ca²⁺ ions are shown as yellow balls.

基 Asp350 と Asp473 によって認識され、その近傍には Cys645(Ala645) と His471 が位置している。また、アルギニン側鎖のアルキル基 (-CH₂-CH₂-CH₂-) の部分には Trp347 と Val469 との疎水的な相互作用も認められる。一方、基質 BA の主鎖部分では、BA のアルギニンのカルボニル酸素と窒素がそれぞれ Arg374 と Arg639 の主鎖カルボニルと水素結合を形成している。また、BA のベンゾイル基のカルボニル酸素と Arg374 の間にも水素結合が認められる。PAD4 はタンパク質中のアルギニン残基（ペプチジルアルギニン）を基質として認識するが、遊離の L-アルギニンは認識しない。これは基質 BA のベンゾイル基のカルボニル酸素に相当する部分が遊離の L-アルギニンには存在しないため、この部分の分子認識が PAD4 の基質認識の特異性に重要であることが示唆される。また、基質 BA のアルギニン側鎖の Guanidino 基部分を認識する残基 (Asp350, His471, Asp473, Cys645) が遊離の L-アルギニンを L-シトルリンに変換する酵素 ADI の触媒残基と一致し、かつ Asp350, His471, Asp473, Cys645 をそれぞれアラニンに置換した変異体では PAD 活性が完全に消失することから、

Asp350, His471, Asp473, Cys645 の 4 残基が PAD4 の活性残基であると考えられる。

6. Ca²⁺ の結合により活性部位が形成（誘起）される

Ca²⁺ 非結合型 PAD4, Ca²⁺ 結合型 PAD4 および Ca²⁺ 結合型 PAD4-基質 BA 複合体の三者の構造を比較すると、PAD4 の活性部位周辺の高次構造が Ca²⁺ が結合することによってダイナミックに変化することがわかる。Ca²⁺ 非結合型 PAD4 の活性部位周辺は disorder していて、非常に不安定である。そのために活性部位付近に大きな窪み (acidic concave surface) が現れ、その表面に酸性のアミノ酸残基が露出している (Fig. 5a)。この酸性の窪みの表面に 2 つの Ca²⁺ (Ca1 と Ca2) が結合すると、disorder していた領域が安定化して活性部位 (active site cleft) が誘起される (Fig. 5b)。また、Ca²⁺ 結合型 PAD4 と Ca²⁺ 結合型 PAD4-BA 複合体の活性部位の構造は一致しているため、2 つの Ca²⁺ (Ca1 と Ca2) が結合することによって酵素の活性部位が誘起され、そこに基質 BA が結合することがわかる (Fig. 5c)。

2 つの Ca²⁺ (Ca1 と Ca2) の結合が活性部位の形成（誘起）に必須であることを実験的に証明するために、Ca1 と Ca2 に配位するアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異体を作成して PAD 活性を測定した。その結果、E351A を除くすべての変異体で PAD 活性の消失が確認された。さらに、N 末端ドメインに結合している Ca²⁺ の配位に関与する残基の中で唯一 C 末端ドメインに存在する Asp388 (Ca3 に配位) をアラニンに置換した変異体では活性の失活が認められないので、PAD4 の活性発現には Ca1 と Ca2 の結合が必須であることがわかる。

これまで PAD4 によるアルギニン残基のシトルリン化になぜ Ca²⁺ が必要なのかわからなかったが、今回の X線結晶構造解析によって、Ca²⁺ の結合が活性部位を誘起して酵素反応の場 (active site cleft) の形成に関与していることが明らかとなった。Ca²⁺ 依存性の酵素としてはこれまでにシス

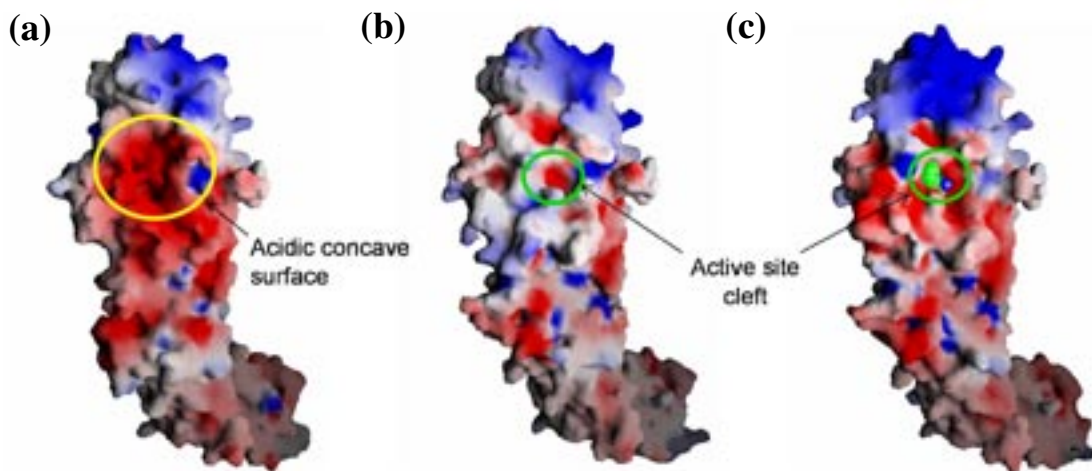


Figure 5
Electrostatic surface potentials of Ca²⁺-free PAD4 (a), Ca²⁺-bound PAD4 (b), and the substrate(BA) complex of Ca²⁺-bound PAD4 (C645A) (c). Surface colors represent the potential from -10 k_BT⁻¹ (red) to +10 k_BT⁻¹ (blue). The substrate, benzoyl-L-arginine amide (BA), is shown as a green space-filling model. The acidic concave face and the active site cleft are marked by green and yellow circles, respectively.

テインプロテアーゼの Calpain[14] や、タンパク質中の Lys と Gln のイソペプチド結合を形成する Transglutaminase[15] の立体構造が報告されている。しかし、これらの酵素では Ca^{2+} の結合により活性部位の構造変化は認められるものの (Calpain では予測されるものの), PAD4 のように disorder していた領域が安定化されて活性部位が誘起されるといったダイナミックな構造変化は認められていない。したがって、今回の X 線結晶構造解析で示された Ca^{2+} による PAD4 の構造変化はこれまでにないまったく新しい酵素活性化機構であるといえる。

7. PAD4 によるヒストン認識と配列特異性

これまで述べてきた基質 BA は PAD4 の人工の基質で、生体内の本来の基質はタンパク質 (ヒストン) のアルギニン残基 (ペプチジルアルギニン) である。そこで、PAD4 によるヒストン認識機構を明らかにすることも踏まえ、 Ca^{2+} 結合型 PAD4 (C645) とヒストンの N 末端領域にあるアルギニン残基を含む 10 残基のペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。なお、用いたヒストンの N 末

端ペプチドは次の 3 つである。

- ヒストン H3 の N 末端ペプチド 1
(Ac-⁴KQTARKSTGG¹³) : peptide H3-1
- ヒストン H3 の N 末端ペプチド 2
(Ac-¹⁴KAPRKQLATK²³) : peptide H3-2
- ヒストン H4 の N 末端ペプチド
(Ac-¹SGRGKGGKGL¹⁰) : peptide H4

この 3 つのペプチドにおいて、ターゲットのアルギニン残基の位置を N とし、その N 末端側の残基を順次 (N-1), (N-2), (N-3), C 末端側を順次 (N+1), (N+2), (N+3) とすると (Figs.6, 7b), いずれの 10 残基のヒストンペプチドも (N-2) から (N+2) の 5 残基のアミノ酸残基の電子密度が確認され、そのうち (N-2) から (N+1) の 4 残基が PAD4 によって認識されることがわかった (Fig. 6)。さらに、その認識様式を比較してみると、いずれのヒストンペプチドも (N-2) から (N+1) の 4 残基の主鎖原子が認識されている。一方、ヒストンペプチドの側鎖の認識はターゲットとなるアルギニン残基の側鎖と (N-2) の残基の側鎖だけで [ペプチド H3-2 の (N-2) は Ala で、 γ 位に酸素原子がないために側鎖の相

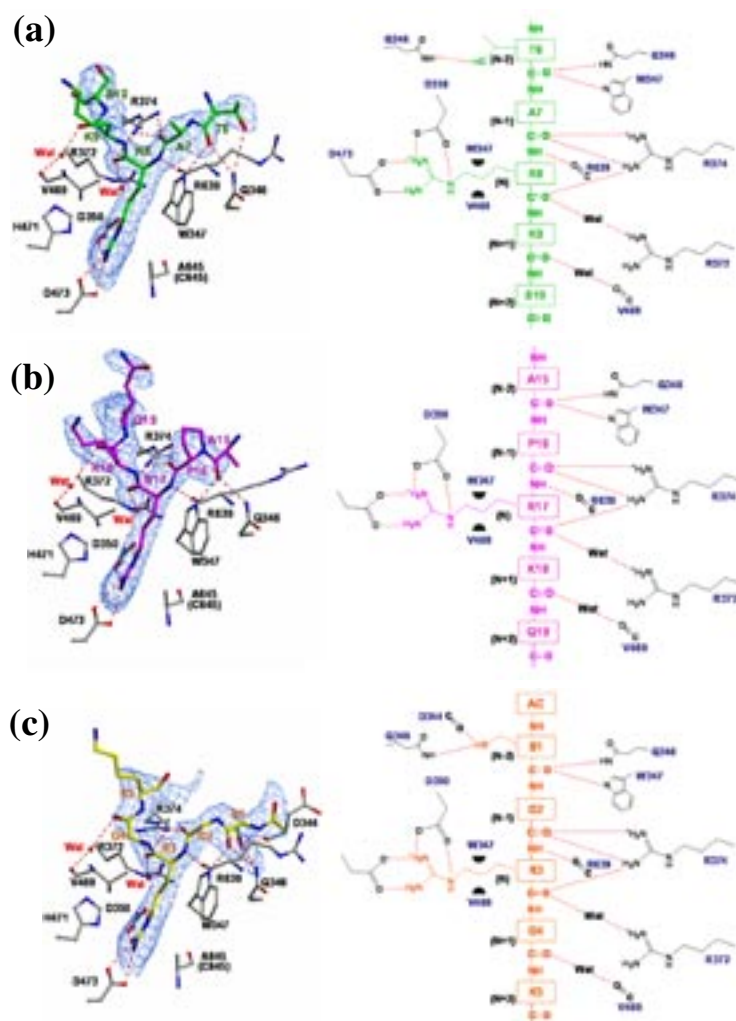


Figure 6 Structures around the active sites of the Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A) in complex with peptides H3-1, H3-2, and H4. Left, ball-and-stick representation of the structures. The protein moiety is colored grey, and the peptides, H3-1 (a), H3-2 (b), and H4 (c) are colored green, magenta, and yellow, respectively. Superimposed are $|F_o| - |F_c|$ electron densities of the peptides, contoured at 2σ . Right, schematic diagrams of the structures on the left. Dotted lines and green half-circles show hydrogen bonds and hydrophobic interactions, respectively.

相互作用は観測されない], 基質認識の配列特異性はきわめて低い。ただ, (N-2) の残基の側鎖が大きいと PAD4 と立体障害を起こすことが考えられるので, (N-2) の残基は小さな側鎖を持つことが必須であると考えられる。事実, これまでに報告されている, PAD4 によりシトルリン化される 5 つのヒストンペプチドの (N-2) の位置は Gly, Ala, Ser などのアミノ酸残基が占めている。

8. ヒストン認識の構造 (コンフォメーション) 特異性は非常に高い

次に, ヒストンペプチドの構造 (コンフォメーション) を比較してみると, その構造は共通してペプチド鎖は折れ曲がった β ターン様の構造をとっていることがわかる (Fig. 7a)。いずれのヒストンペプチドも (N-2) から (N+2) の 5 残基のアミノ酸残基の電子密度が確認され, そのうち (N-2) から (N+1) の 4 残基が PAD4 によって認識されている (Fig. 6)。したがって, (N+2) の残基は電子密度は確認されるものの PAD4 には認識されていないことになる。こ

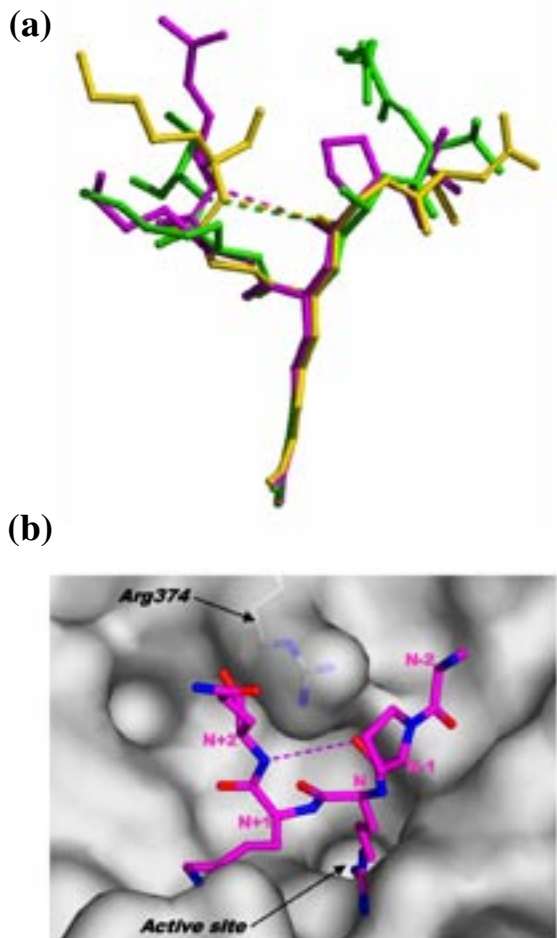


Figure 7
Histone N-terminal structures. (a) structural comparison of PAD4-bound forms. Peptides H3-1, H3-2, and H4 are shown as ball-and-stick representations colored green, magenta, and yellow, respectively. (b) top view of the peptide H3-2 structure shown in (a), together with a molecular surface representation near the active site. The weak intra-peptide interactions between the backbone oxygen at (N-1) position and the backbone nitrogen at (N+2) position are shown as dotted line.

れはヒストンペプチドが, PAD4 の活性部位周辺の形状と Arg374 との相互作用によって, 折れ曲がった β ターン様の構造が誘起されるためである (Fig. 7b)。そのためにヒストンペプチド分子内の (N-2) のカルボニル酸素と (N+2) の窒素の間に水素結合様の弱い相互作用が形成され, (N+2) の残基が安定化される。なお, 典型的な β ターン構造では (N-1) のカルボニル酸素と (N+2) の窒素の間に水素結合が形成されているが, ヒストンペプチドの β ターン様の構造では両原子間の距離は水素結合の距離よりも長く, 水素結合の形成までには至っていない。

このように, 通常は一定の決まった構造をとっていないヒストンの N 末端領域も PAD4 に認識されると折れ曲がった β ターン様の構造をとるようになる。このことは PAD4 の基質特異性を考える上に非常に重要である。PAD4 は二次構造を形成している領域のアルギニン残基は認識しないことが生化学的な実験から明らかにされているが [16], これは一定の決まった構造をとっていない柔軟性に富む領域にあるアルギニン残基のみが PAD4 によって認識されるためである。PAD4 のターゲットとなるアルギニン残基が一定の二次構造を形成している領域にあると, 折れ曲がった β ターン様の構造が誘起できないので PAD4 には認識されない。すなわち, PAD4 によるヒストン認識では, アミノ酸残基の配列特異性はきわめて低いが, 構造 (コンフォメーション) の特異性は非常に高いといえる。ヒストンの N 末端領域にあるアルギニン残基が前後のアミノ酸配列にあまり関係なく優先的に認識されて PAD4 の格好のターゲットとなるのは, まさに PAD4 のこのようなヒストン (基質) 認識の特異性に起因しているといえる。

9. まとめ

今回, 私たちは Ca^{2+} 非結合型 PAD4, Ca^{2+} 結合型 PAD4, Ca^{2+} 結合型 PAD4-基質複合体の構造を決定し, 3 者の構造比較から「C 末端ドメインに結合する Ca^{2+} によって酵素の活性部位が誘起され, そこに基質分子が結合する」という新規の酵素活性化機能を明らかにしてきた。このような Ca^{2+} による酵素活性化機構はこれまでに構造が決定されている Ca^{2+} 依存性の酵素ではまったく認められていないので, まったく新しい酵素活性化機構として非常に興味深い。また, ヒストンペプチドとの複合体の構造解析からは, 「通常は一定の決まった構造をとっていないヒストンの N 末端領域も PAD4 に認識されると折れ曲がった β ターン様の構造をとるようになる」ことや, 「PAD4 によるヒストン認識では, 配列特異性は低いが, 構造の特異性は高い」ことなど, 新規のヒストン認識に関する構造科学的な知見が数多く得られた。これらの研究成果は今後の真核生物の転写研究に大いに役立つものと思われる, 今後の展開が楽しみである。さらに, 今回得られた基質認識に関する構造学的知見は, 関節リウマチの新規薬剤の開発に必要な PAD4 の阻害候補物質の設計にも有効で, PAD4-阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を通じて, より特異性に優れた阻害活性の高い化合物の創製が期待される。

謝辞

ここで紹介した研究は、横浜市立大学の山田道之教授（現、名誉教授）との共同研究で行ったものです。山田道之先生及び研究室の中島克彦博士（現、国立がんセンター研究員）、また、ヒストンペプチドの合成にご協力いただいた日高雄二博士（近畿大学理工学部）に、ここに深く感謝いたします。

また、PAD4のX線結晶構造解析は放射光X線の利用なしでは決して成功しませんでした。PFおよびPF-ARでのデータ収集にご協力いただいた若槻壮市教授、加藤龍一助教授、松垣直宏博士、五十嵐教之博士、鈴木守博士（現、大阪大学蛋白質研究所）、また、SPRING-8でのデータ収集にご協力いただいた山本雅貴博士、熊坂崇博士（現、東工大）、三浦圭子博士に心より感謝いたします。

なお、本研究は文部科学省「タンパク3000プロジェクト」（中核機関：横浜市立大学）の研究助成によって進められた。（原稿受付：2006年6月20日）

引用文献

- [1] Nakashima, K., Hagiwara, T., and Yamada, M. *J. Biol. Chem.* **277**, 49562-49568 (2002).
- [2] Vossenaar, E. R., Zendman, A. J. W., Venrooij, W. J., and Pruijn, G. J. M. *BioEssays* **25**, 1106-1118 (2003).
- [3] Cuthbert, G. L. *et al. Cell* **118**, 545-553 (2004).
- [4] Wang, Y. *et al. Science* **306**, 279-283 (2004).
- [5] Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. *EMBO Rep.* **3**, 39-44 (2002).
- [6] Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. *Science* **293**, 853-857 (2001).
- [7] Suzuki, A. *et al. Nat. Genet.* **34**, 395-402 (2003).
- [8] van Boekel, M. A., Vossenaar, E. R., van den Hoogen, F. H., and van Venrooij, W. J. *Arthritis Res.* **4**, 87-93 (2002).
- [9] Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., and Sato, M. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 777-783 (2004).
- [10] Arita, K., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Yamada, M., and Sato, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5291-5296 (2006).
- [11] Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Yamada, M., and Sato, M. *Acta Crystallogr.* **D59**, 2332-2333 (2003).
- [12] Das, K. *et al. Structure* **12**, 657-667 (2004).
- [13] Humm, A., Fritsche, E., Steinbacher, S., and Huber, R. *EMBO J.* **16**, 3373-3385 (1997).
- [14] Khorchid A., and Ikura M. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 239-241 (2002).
- [15] Ahvazi, B., Kim, H. C., Kee, S. H., Nemes, Z., and Steinert, P. M. *EMBO J.* **21**, 2055-2067 (2002).
- [16] Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. E., and Steinert, P. M. *J. Biol. Chem.* **271**, 30709-30716 (1996).

著者紹介

有田恭平 Kyouhei ARITA

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻
TEL: 045-508-7227

FAX: 045-508-7365

e-mail: kyouhei@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

略歴：横浜市立大学大学院総合理学研究科博士後期課程修了（2006年4月）、博士（理学）。現在、学術振興会特別研究員（京都大学大学院工学研究科分子工学専攻）。

清水敏之 Toshiyuki SHIMIZU

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻・準教授

TEL: 045-508-7226

FAX: 045-508-7365

e-mail: shimizu@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

略歴：東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了（1989年）、博士（薬学）。キリンビール、蛋白工学研究所、奈良先端科学技術大学院助手を経て、2001年4月より横浜市立大学大学院総合理学研究科助教授。2005年4月、大学の法人化により公立大学法人横浜市立大学国際総合科学研究科準教授。

橋本 博 Hiroshi HASHIMOTO

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻・助手

TEL: 045-508-7227

FAX: 045-508-7365

e-mail: hash@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

略歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程後期修了（2000年）、博士（工学）。学術振興会特別研究員を経て、2001年4月より横浜市立大学大学院総合理学研究科助手。2005年4月、大学の法人化により公立大学法人横浜市立大学国際総合科学研究科助手。

佐藤 衛 Mamoru SATO

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻・教授

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-25

TEL: 045-508-7225

FAX: 045-508-7365

e-mail: msato@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

略歴：大阪大学大学院工学研究科博士後期課程後期修了（1983年）、工学博士。摂南大学薬学部研究員・助手、大阪大学蛋白質研究所教務職員・助手・助教授を経て、1996年4月より横浜市立大学大学院総合理学研究科教授。2005年4月、大学の法人化により公立大学法人横浜市立大学国際総合科学研究科教授。