

博士論文

新規癌治療標的としてのメチル基転移酵素 SMYD3 に関する検討

吉岡 佑一郎

目次

目次	1
略語一覧	3
序文	5

第1章 メチル基転移酵素 SMYD3 による AKT1 タンパク質の PH ドメインにおけるメチル化修飾と AKT1 活性化

1. 目的	11
2. 実験材料および方法	12
3. 結果	24
4. 考察	44

第2章 メチル基転移酵素 SMYD3 と HER2 タンパク質のホモ 2 量体化の関係

1. 目的	49
2. 実験材料および方法	50
3. 結果	57
4. 考察	66

第3章 まとめ・今後の展望	69
謝辞	71
引用文献	72

略語一覽

ATCC: American Type Culture Collection

BrdU: 5'-bromo-2'-deoxyuridine

BSA: bovine serum albumin

CCK8: cell counting kit 8

D-MEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DTT: dithiothreitol

ECD: extra cellular domain

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

E-MEM: Eagle's Minimum Essential Medium

HM: hydrophobic motif

ICC: Immunocytochemistry

IP: immunoprecipitation

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LSD1: lysine-specific demethylase 1

NC: Negative control

NRG1: neuregulin1

PBS: phosphate-buffered saline

PH: pleckstrin homology

PRMT1: Protein Arginine Methyltransferase 1

PRMT6: Protein Arginine Methyltransferase 5

SAM: S-adenosyl-L-[methyl-³H]-methionine

SMYD3: SET And MYND Domain Containing 3

siRNA: small interfering RNA

TM: Transmembrane domain

WB: Western blot

序文

タンパク質の翻訳後修飾とは、タンパク質の化学的修飾であり標準的な細胞生物学や病因学のあらゆる面において多種多様な機能を有することが知られている。その中でメチル化修飾に関しては、ヒストンタンパク質のメチル化といったエピジェネティクス制御に関わる修飾と、非ヒストンタンパク質の翻訳後修飾の2つに大別される[1]。タンパク質のメチル化修飾という現象自体は1959年に発見されていたが、機能に関しては長く不明であった[2]。また、メチル化修飾に関してはヒストンメチル化修飾の半減期がヒストンタンパク質自体の半減期とほぼ同じ長さであることから、修飾自体は不可逆的なものと考えられてきた[3]。その後、メチル化修飾に関与する酵素として、タンパク質メチル基転移酵素が発見され、lysine-specific demethylase 1 (LSD1)を始め、いくつかのタンパク質脱メチル化酵素が発見されたことで、メチル化は調整可能な修飾であることが明らかになった[4]。21世紀に入りヒストンメチル化を中心として急速に機能解析が進み、現在はリン酸化修飾やユビキチン化修飾などと同様にタンパク質翻訳後修飾の1つとして細胞機能において重要な役割を果たすことが認識されてきている[5-9]。

また、メチル基供与体である S-adenosyl-L-methionine の存在がメチル化修飾に

は不可欠であり、この補酵素がリン酸化修飾に必要な ATP に次いで生体内で 2 番目に多いという事実もメチル化修飾の重要性を示唆している[10]。メチル化にはモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化の 3 タイプ存在し、メチル化修飾を受ける残基は必須アミノ酸ではリジンとアルギニンのメチル化の解析が進んでいる。ヒストンタンパク質、DNA のメチル化修飾に関しては特に活発に研究が進んでおり、転写の調整において重要な役割を持つこと、メチル化修飾の部位、修飾タイプの違いにより機能が変化することが判ってきている。

これらのヒストンメチル化修飾の研究の発展により、その調整不全ががんの発生や進行に関与していることが明らかになっている[9, 11, 12]。その一方で、非ヒストンタンパク質のメチル化修飾に関してもいくつか報告があり、例えば腫瘍発生において重要な役割を持つ遺伝子である p53、RB1、STAT3 などにおいて非ヒストンタンパク質のメチル化が報告されており、がん細胞における機能も徐々に明らかになってきている[11, 13-16]。非ヒストンタンパク質のメチル化修飾に関して、具体的には以下の 5 つの機能が報告されている。①他のタンパク質修飾を増強、もしくは阻害、②タンパク質間相互作用の増強、もしくは阻害、③タンパク質安定性への寄与、④タンパク質局在の変化、⑤プロモーター接合への影響、である[17-25]。また、これらの機能は酵素と基質の組み合わせで異なることが示されており[1]、具体的なメチル化修飾が起きる酵素と基質の組み合わせ

せ、メチル化修飾を受ける残基、またその個々の機能などに関しては現時点ではほとんどが解明されていないのが現状である。

メチル基転移酵素の一つである SET And MYND Domain Containing 3 (SMYD3) は 2004 年に浜本らにより遺伝子が同定され、*in vitro* で SMYD3 が大腸がんや肝細胞がんにおいて過剰発現していること、細胞を用いた実験系では SMYD3 ががん細胞における細胞増殖に関わることが報告された。その後、VEGFR1 や MAP3K2 が SMYD3 にメチル化される基質であることが発見され、その機能が報告された[23, 26]。

本研究では、メチル基転移酵素 (SMYD2、SMYD3、PRMT1、PRMT6)とがん関連タンパク質を組み合わせで行った *in vitro* methyltransferase assay により、AKT1 と HER2 が SMYD3 によりメチル化されることを同定した。AKT1 タンパク質は PH (pleckstrin homology)ドメイン、キナーゼドメイン、HM (hydrophobic motif)ドメインにより構成される (図 1A)。AKT1 は自身の PH ドメインと細胞膜のリン脂質であるフォスファチジルイノシトール 3 リン酸が結合することで細胞膜上にて、PDK1 や mTORC2 によって Thr 308 と Ser 473 でリン酸化修飾を受け、様々なシグナル経路を介して、細胞周期、血管新生、腫瘍形成などに関与している[27]。AKT1 の異常な活性化は様々な疾患に関与しており、AKT1 が過剰発現する悪性腫瘍としては、大腸がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がんなどが

報告されている[28,29]。もう1つの基質であるHER2タンパク質は、ErbB familyタンパク質の一つである。主に細胞膜上に存在しており、細胞外ドメイン (ECD)、膜貫通部 (TM: Transmembrane domain)、細胞内ドメインから構成されており、さらにECDは4つの小ドメインにより構成されており、それぞれECD I、ECD II、ECD III、ECD IVと呼ばれている (図 1B)。このうちECD IIは、HER2タンパク質の2量体形成における接合部として知られている[30]。HER2以外のErbB Familyタンパク質 (EGFR、HER3、HER4)は、受容体に特定のリガンドが結合することで細胞外ドメインが、活性化型と呼ばれる構造に変化し、2量体を形成する。一方でHER2タンパク質は、受容体に結合するリガンドが見つかっておらず、常に2量体を形成できる活性化型として存在していると考えられている[31]。HER2は2量体化によって細胞内ドメインで自己リン酸化が起こり、下流のシグナルを活性化させる。その結果、細胞増殖、分化、血管新生やアポトーシスに関与している。HER2が過剰発現する悪性腫瘍としては、乳がん、大腸がん、胃がんなどが報告されている[32]。

非ヒストンタンパク質 AKT1、HER2 に関しては、メチル化修飾されること自体これまで報告されていない。我々は本研究において、SMYD3 による AKT1、HER2 非ヒストンタンパク質メチル化修飾の機能解析を行い、がん細胞における SMYD3 の重要性を検討した。

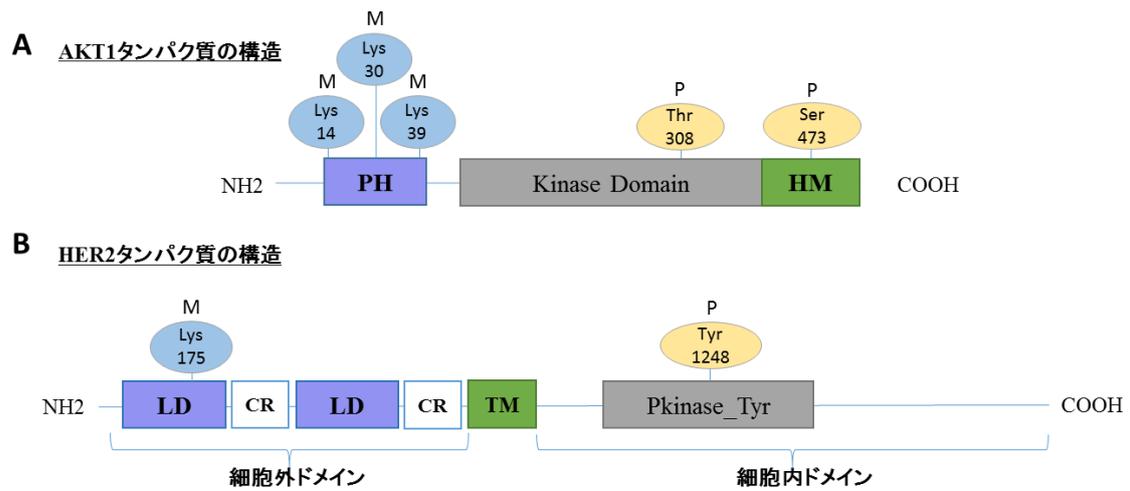


図 1. AKT1 と HER2 タンパク質のドメイン構造

A. AKT1 タンパク質は、PH ドメイン、キナーゼドメイン、HM ドメインにより構成される。リン酸化部位は Thr 308 と Ser 473 が同定されており、それぞれキナーゼドメインと HM ドメインに存在する。本研究で同定されたメチル化部位である、Lys 14、Lys 30、Lys 39 を図に示す。**B.** HER2 タンパク質は、細胞外ドメイン、膜貫通部、細胞内ドメインにより構成される。ECD はさらに 4 つの小ドメインにより構成されており、それぞれ ECD I、ECD II、ECD III、ECD IV と呼ばれている。このうち、ECD II は HER2 タンパク質の 2 量体形成において接合部として知られている。本研究で同定されたメチル化部位である Lys 175 と、代表的なリン酸化部位である Tyr 1248 を図に示す。

第1章

メチル基転移酵素 SMYD3 による AKT1 タンパク質の PH ドメインにおけるメ
チル化修飾と AKT1 活性化

1. 目的

AKT1 は乳がん、大腸がん、卵巣がん、多発性骨髄腫など様々な悪性腫瘍において高発現、活性化しており、AKT1 活性の調整不全は腫瘍形成において重要な役割を果たしていることが知られている[28, 29]。AKT1 の翻訳後修飾に関しては、PDK1 や mTORC2 など特定の酵素によるリン酸化修飾やユビキチン化修飾に関する報告は散見される[29, 33]が、メチル化修飾に関する報告はこれまでなされていない。今回、複数のメチル基転移酵素 (SMYD2、SMYD3、PRMT1、PRMT6)を用いた *in vitro* methyltransferase assay によりメチル化酵素 SMYD3 が AKT1 タンパク質をメチル化することを発見した。本研究では、がんにおける SMYD3 による AKT1 タンパク質メチル化修飾の機能を明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料および方法

1. 細胞培養

大腸がん細胞株 SW480 と転移乳がん細胞株 MDA-MB-231、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 293T、子宮頸がん由来細胞株 HeLa は ATCC より 2003 年、または 2013 年に購入したものを使用した。すべての細胞株は単層で以下の培養液で培養した。293T 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)、HeLa 細胞は Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM)、SW480 細胞と MDA-MB-231 細胞は Leibovitz's L-15 を使用し、それぞれの培養液には 10% の FBS と 1% の抗生物質 (Sigma-Aldrich) を添加した。293T 細胞と HeLa 細胞は 5% 二酸化炭素のもと、SW480 細胞と MDA-MB-231 細胞は二酸化炭素のない条件下で 37 度の恒温器内で培養した。遺伝子導入には FuGENE[®] 6 (Promega) もしくは FuGENE[®] HD (Promega) を、販売元のプロトコールに従って使用した[9, 12]。

2. 抗体

1 次抗体は以下のものを使用した。

抗 FLAG 抗体

1:1000 in Western blot (WB), ウサギモノクローナル抗体 F7425; Sigma-Aldrich

抗 HA 抗体

1:1000 in Immunocytochemistry (ICC), ラットモノクローナル抗体,

#11867423001; Roche Applied Science

抗 SMYD3 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D2Q4V; Cell Signaling Technology

抗 AKT 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, C67E7; Cell Signaling Technology

抗リン酸化 AKT (Thr 308)抗体

1:500 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D25E6; Cell Signaling Technology

抗 α -tubulin 抗体

1:1000 in WB, マウスモノクローナル抗体, DM1A; CALBIOCHEM

抗 mTOR 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, 7C10; Cell Signaling Technology

抗リン酸化 mTOR (Ser 2448)抗体

1:500 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D9C2; Cell Signaling Technology

抗 Na, K-ATPase 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, #3010; Cell Signaling Technology

抗 K14 モノメチル化 AKT1 抗体

1:1000 in WB, ウサギポリクローナル抗体, 特注; AnaSpec/Eurogentec

3. *In vitro* methyltransferase assay

本アッセイは、AKT1 がメチル化されるか否かを判定するためのスクリーニングと、AKT1 ペプチドのメチル化を検討する目的で行った。10 μ l のメチル活性化バッファー (50 mM の Tris-HCl, 10 mM の DTT と 10 mM の MgCl₂ の混合液)の存在下に、AKT1 組み換えタンパク質 (Thermo Fisher Scientific)と SMYD3 酵素 (in house)、メチル基供与体である 2 μ Ci のトリチウムラベルした S-adenosyl-L-[methyl -³H]-methionine (SAM; PerkinElmer)を 30°Cの恒温槽で 2 時間反応させた。タンパク質は Mini-PROTEAGEN® TGX™ Precast gel (Any kD; Bio-Rad)上に分離され、EN³HANCE™ Spray Surface Autoradiography enhancer (PerkinElmer)にてシグナルを増強させた上でフルオログラフィーにて可視化した。タンパク質の存在は MemCode™ Reversible Stain (Thermo Fisher Scientific)を用いて可視化した。3 つのメチル化部位を含んだ AKT1 ペプチド (Thermo Fisher Scientific, P2999)を用いた同アッセイでは、サンプルは Mini-PROTEAGEN® Tris-Tricine gel (Bio-Rad)を用いて分離した。AKT1 ペプチドのアミノ酸配列はデータシートより引用した。

4. 質量分析法

BSA もしくは SMYD3 と *in vitro* で反応させて得られた AKT1 サンプル、293T 細胞や HeLa 細胞から免疫沈降されて得られた AKT1 サンプルは SDS-PAGE で分離し、Simply Blue Safe Stain (Thermo Fisher Scientific)で染色した。AKT1 のバンドはトリプシンとエンドプロテイナーゼ Asp-N を用いてゲル内に分離、消化したものを、Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて LC-MS/MS にて解析した。ペプチドは 0-35%のバッファーB (100%アセトニトリルと 0.1%のギ酸の混合液)を用いて、300 nL/min の速度で 10 分以上かけて nano ESI spray column (Nikkyo Technos)によって分別した。質量分析計は陽イオンモードで、データ依存的な TOP10 法を用いて MS と MS/MS のスペクトラムを得た。その MS/MS スペクトラムは local MASCOT server (Version 2.5; Matrix Sciences)を使用したデータベースを基に調べた。*In vivo* のメチル化の量的解析として、AKT1 ペプチドは標的 MS/MS 法を用いて観察した。この実験は、理化学研究所の堂前直氏、鈴木健裕氏によって行われた。

5. 立体構造解析

AKT1 タンパク質の立体構造解析は Protein Data Bank (entry code, 4EJN)を元に行った[34]。オンコセラピーサイエンスの松尾洋氏が解析を担当した。

6. ウェスタンブロッティング法

プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences) とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences) を含んだ CellLytic™ M 溶液 (Sigma-Aldrich) を用いて溶解した細胞よりサンプルを準備し、全ての細胞の溶解物や IP 産物などのサンプルはニトロセルロース膜に移した。タンパク質のバンドはホースラディッシュペルオキシダーゼ接合抗体 (GE Healthcare) と反応させ、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare) を用いて可視化した。

7. 膜タンパク質

野生型もしくは置換型 AKT1 を SMYD3 とともに HeLa 細胞に遺伝子導入した後に、膜タンパク質は Mem-PER™ plus membrane protein extraction kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した。

8. 免疫沈降法

293T 細胞に野生型 AKT1 発現ベクター (pcDNA3.1-FLAG-HA-AKT1) もしくは置換型 AKT1 発現ベクター (pcDNA3.1-FLAG-HA-AKT1-K14A、K14R、K30A、K39A、K14A/K30A、K14A/K39A、K30A/K39A、K14A/K30A/K39A) を pcDNA3.1-SMYD3 発現ベクターの存在下に遺伝子導入を行った。48 時間の培養後、細胞を

100 ng/ml の EGF (Promega)にて 5 分間刺激し、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences, 10%)とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences, 4%)を含んだ CelLytic™ M 溶液 (Sigma-Aldrich)を用いて溶解した。300 µg の細胞抽出物は抗 FLAG® M2 affinity gel (Sigma-Aldrich)と共に夜通し恒温放置した。1 ml の PBS でビーズを 3 回洗浄した後に、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)を含んだ溶出液 (100 µg/ml 3X FLAG® Peptide (Sigma-Aldrich) in PBS)を用いてビーズに付着したタンパク質を溶出した。溶出したサンプルは Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific)と共に煮沸し、WB に使用した。

9. ELISA 試験

ELISA 試験は間接的 ELISA 法にて行い、ELISA プレートの壁は抗原で覆い (10 µg of peptide/well)、濃度の違う血清と抗体を用いた。発色はホースラディッシュペルオキシダーゼ接合 2 次抗体と発色性基質としての *o*-フェニレンジアミンを用いて行い、比色分析した。発色性基質の光学的濃度は 492 nm における吸光度として計測した。

10. siRNA 遺伝子導入

siRNA オリゴヌクレオチド 2 本鎖は、Sigma-Aldrich より購入した。siEGFP は

コントロールとして使用した。siRNA の配列は表に記載する (表 1)。siRNA は最終濃度 100 nM で調整し、SW480、MDA-MB-231 に Lipofectamine[®] RNAiMax Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて遺伝子導入した。

siRNA 名	配列
siEGFP	Sense: 5' GCAGCACGACUUCUUCAAG 3' Antisense: 5' CUUGAAGAAGUCGUGCUGC 3'
siSMYD3#1	Sense: 5' GAUUGAAGAUUUGAUUCUA 3' Antisense: 5' UAGAAUCAAUCUCAAUC 3'
siSMYD3#2	Sense: 5' CAGCAAUUCUGAACGGCUU 3' Antisense: 5' AAGCCGUUCAGAAUUGCUG 3'

表 1: siRNA 配列

11. SMYD3 特異的阻害剤

SMYD3 特異的阻害剤として Cristiano Simone らの研究グループで開発された BCI-121 を本研究においても使用した[35]。SW480 細胞と MDA-MB-231 細胞に対して、BCI-121 を 0, 10, 50 μM の濃度で 72 時間反応させた。その後 SW480 細胞に 100 ng/ml の EGF、MDA-MB-231 細胞に 100 ng/ml の neuregulin1 (NRG1)により 5 分間の刺激を与え、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences, 10%)とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences, 4%)を含んだ CellLytic™M 溶液を用いて溶解した。細胞溶解物を SDS-PAGE で分離し、抗 K14 モノメチル化 AKT1 抗体、抗リン酸化 AKT1 抗体 (Thr 308, Cell Signaling Technology)、抗 AKT 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 α -Tubulin 抗体 (CALBIOCHEM)を用いてウェスタンブロットを行った。

12. 免疫細胞染色

HeLa 細胞は 1×10^6 cells/dish の濃度で 2 枚の 10 cm 培養皿に撒き、24 時間の培養ののち、野生型 AKT1 発現ベクター (pcDNA3.1-FLAG-HA-AKT1)もしくは K14A 置換型 AKT1 発現ベクター (pcDNA3.1-FLAGHA-AKT1-K14A)を Fugene® HD (Promega)を用いて遺伝子導入した。48 時間後に、細胞をトリプシン処理し 2×10^4 cells/well の濃度で 4 well チャンバーガラススライドに撒き直し、血清を含

まない培養液に変更した。24 時間培養後、5 分間 EGF (100 ng/ml)刺激を行い PBS で 2 回洗浄した。PBS を除去したのちに 4%のparaformaldehydeにて 4°C で 30 分固定し、室温にて PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。続いて 0.1%のトリトン X-100 にて室温で 3 分間透過処理したのちに、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。次に 3%BSA にて室温 1 時間でブロッキングし、抗 HA 抗体 (1:1000, ラットモノクローナル抗体, #11867423001; Roche Applied Science)を 3%BSA で希釈した溶液を加え、室温で一晩反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 (1:1000, Alexa Fluor® 488 conjugated 抗ラット抗体, Thermo Fisher Scientific) と 5 µg/ml の Alexa Fluor® 594 conjugated 抗 Wheat Germ Agglutinin (WGA)抗体に室温 1 時間、攪拌機の上で反応させた。その後、PBS で 4 回洗浄の上、封入剤として DAPI VECTASHIELD® (Vector Laboratories)を各 well に滴下した。最後にスライドガラスで表面を覆い、共焦点顕微鏡 (Leica, SP5 Tandem Scanner Spectral 2-Photon Confocal)で観察を行った[36]。

13. AKT1 過剰発現細胞の調整

SW480 細胞に対して、10%FBS を含んだ L-15 で 24 時間培養し、FLAG-HA-AKT1-WT 発現ベクターもしくは FLAG-HA-AKT1-K14A 発現ベクターを FuGENE® HD (Promega)を用いて遺伝子導入した。48 時間の培養の後、細胞をト

リプシン処理して撒き直し、Geneticine[®] (Thermo Fisher Scientific)を 1.0 mg/ml 含んだ培養液で 15 日間培養し、形成されたコロニーをピックアップした。AKT1 と Thr 308 におけるリン酸化 AKT1 の発現レベルを調べるために、細胞はプロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences) とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)を含んだ CellLytic[™] M 溶液 (Sigma-Aldrich)を用いて溶解し、抗リン酸化 AKT (Thr 308)抗体、抗 FLAG 抗体、抗 AKT 抗体、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫ブロットを行った。

14. 細胞周期、細胞増殖アッセイ

5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) flow kit (BD Biosciences)を用いて細胞周期動態を把握し、増殖性細胞の DNA における BrdU の結合状態などを計測した[37-40]。当アッセイは販売元のプロトコールに従った。野生型 AKT1 (AKT1-WT)もしくは置換型 AKT1 (AKT1-K175A)を過剰発現する SW480 細胞を 3 クローンずつ準備し、10 μ M の BrdU を加えて 37 度で 30 分培養した。浮遊した細胞、接着した細胞も含めてそれぞれ回収し、パラフォルムアルデヒドとサポニンを含んだ溶液で固定し、DNase とともに 37 度で 1 時間培養した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 接合抗 BrdU 抗体 (1:50, BD Biosciences)を加え、さらに室温で 20 分培養した。細胞は洗浄用バッファーで洗浄し、DNA は 20 μ l の 7-amino-actinomycin D

(7-AAD)で染色し、フローサイトメトリー解析は BD™ LSR II (BD Biosciences) とソフトウェア FlowJo を用いて行った。細胞増殖能に関しては、野生型 AKT1 (AKT1-WT)もしくは置換型 AKT1 (AKT1-K175A)を過剰発現する SW480 細胞株を 3 クローンずつ準備し、cell counting kit 8 (CCK8, Dojindo)を用いて販売元のプロトコールに従い実験を行った。

15. 膜タンパク質の抽出

HeLa 細胞は 10 cm の培養皿に 1×10^6 cells/dish で撒き 24 時間培養した後、FLAG-HA-AKT1-WT もしくは FLAG-HA-AKT1-K14A を Fugene® HD (Promega)を用いて遺伝子導入した。48 時間の培養の後、細胞は 100 ng/ml の EGF にて刺激した後スクレーパーで回収した。Mem-PER™ plus membrane protein extraction kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて販売元のプロトコールに従い、膜タンパク質の抽出を行った。

16. 統計解析

統計解析はスチューデント t 検定を用いて行い、平均値±標準偏差を 3 つの独立した実験を基に行った。P<0.05 の際に統計学的有意差があるとした。

3. 結果

In vitro での SMYD3 による AKT1、PH ドメインのリジン残基のメチル化

がん遺伝子である AKT1 がメチル基転移酵素によりメチル化されるか否かを調べるために、メチル基転移酵素 (SMYD2、SMYD3、PRMT1、PRMT6)を用いて *in vitro* methyltransferase assay によるスクリーニングを行ったところ、SMYD3 の存在下でのみメチル化シグナルが認められた。この結果を元に SMYD3 と HER2 を組み合わせた *in vitro* methyltransferase assay を行い、SMYD3 の存在下にメチル化シグナルが出現することを確認した (図 2A)。またメチル化部位の特定のために LC-MS/MS 解析を行った結果、AKT1 タンパク質において、PH ドメイン上のリジン (Lysine: K, Lys)である、Lys 14、Lys 30、Lys 39 を含むフラグメントイオンの実測 m/z 値がフラグメントイオンの予測 m/z 値と比較して 14Da の相違が観察され、これらの部位で SMYD3 によってモノメチル化されることが明らかになった (図 2B、C、図 3 及び図 4)。

次に、判明したこれらの部位でのメチル化を裏付けるために、3つのメチル化領域を含んだペプチドを用いて *in vitro* methyltransferase assay を行ったが、ペプチドでも同様に SMYD3 によるメチル化シグナルが同定され、SMYD3 によるメチル化を確認できた (図 5A)。

次に、これらのメチル化部位を含むアミノ酸配列を異なる種間で比較した。なおアミノ酸配列は AKT1 ペプチドのデータシートより引用した。メチル化部位のうち Lys 14 は異なる種間において、ヒト (*Homo Sapiens*)から線虫 (*Caenorhabditis elegans*)まで広く保存されていること、Lys 30 と 39 に関してはヒトからゼブラフィッシュ (*Danio Rerio*)で保存されていることがわかった。また、ホスホイノシタイドと結合するポケット部分を占有している Glutamic acid 17 (Glu 17)も同様に広い種間で保存されていることが明らかになった (図 5B)。なお Glu 17 はホスホイノシタイドの結合ポケットにあたる部分に位置しており、AKT1 活性化に関与していることが報告されている[41, 42]。

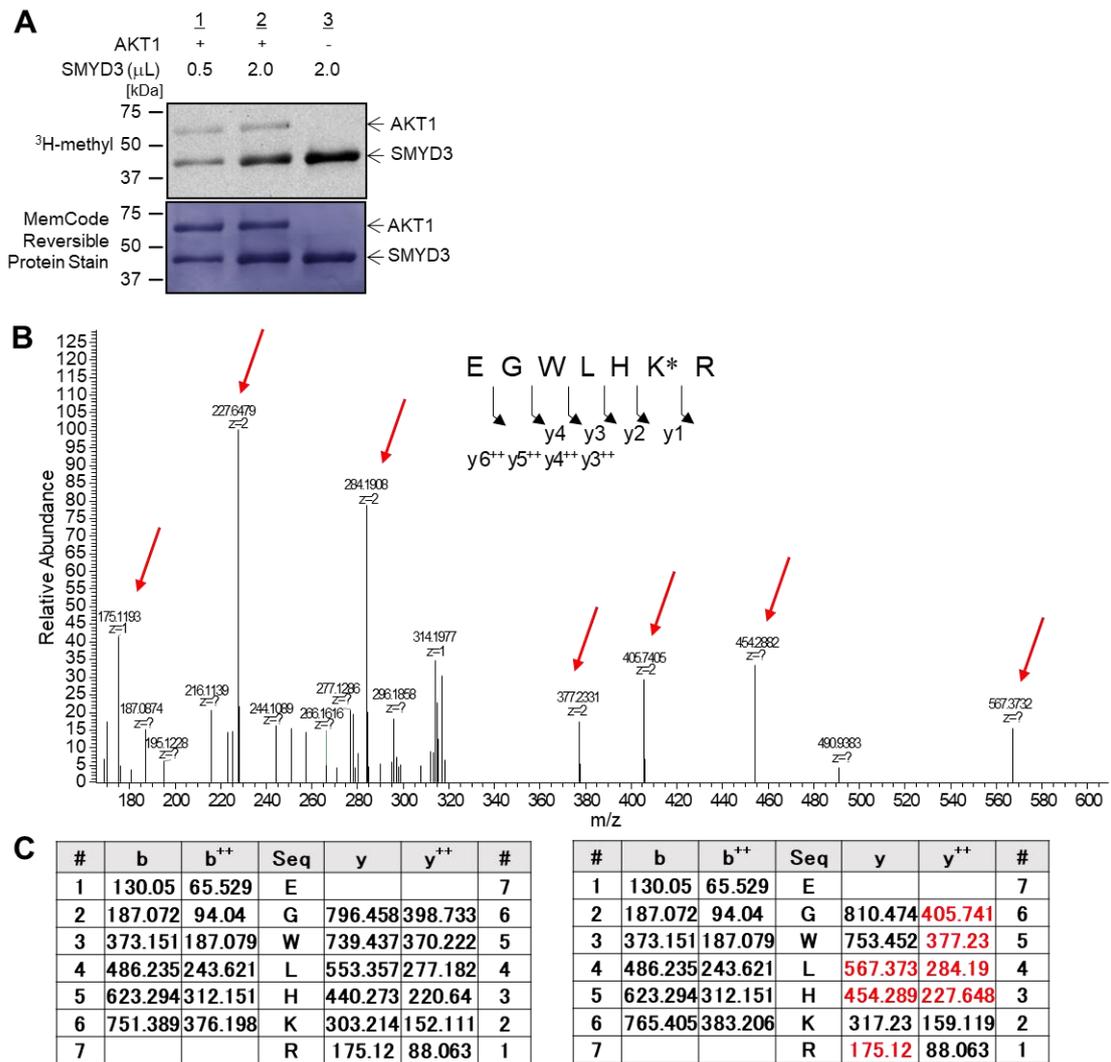
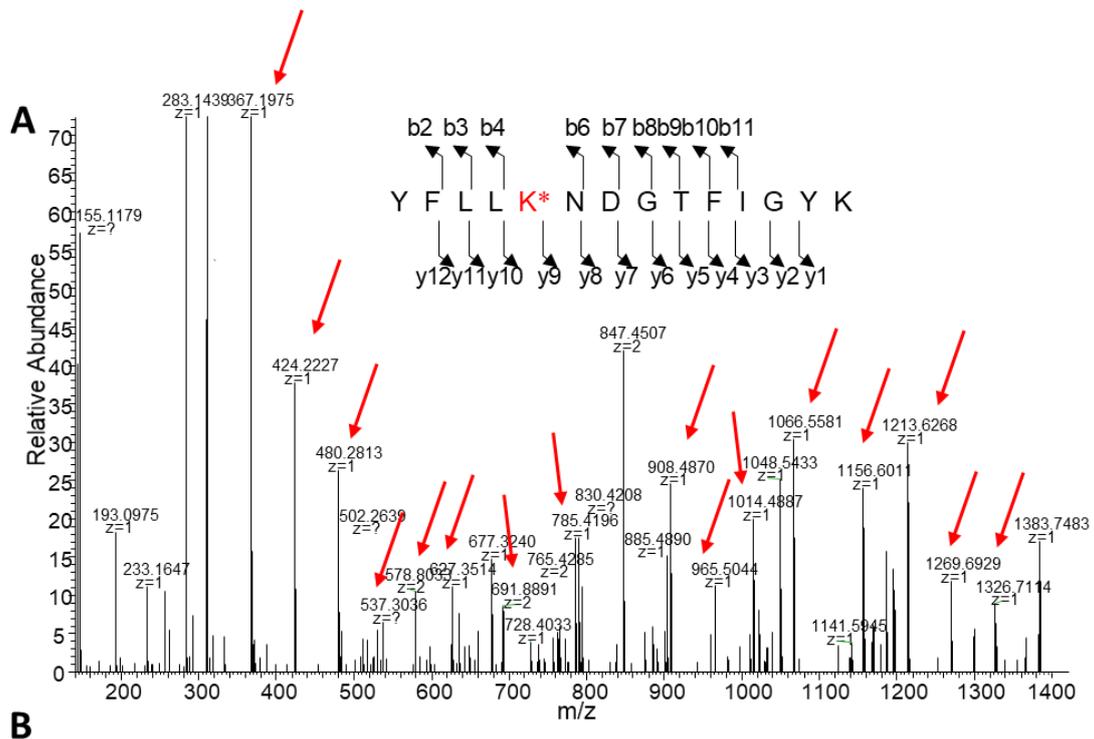


図 2. *In vitro* での SMYD3 による AKT1 のメチル化

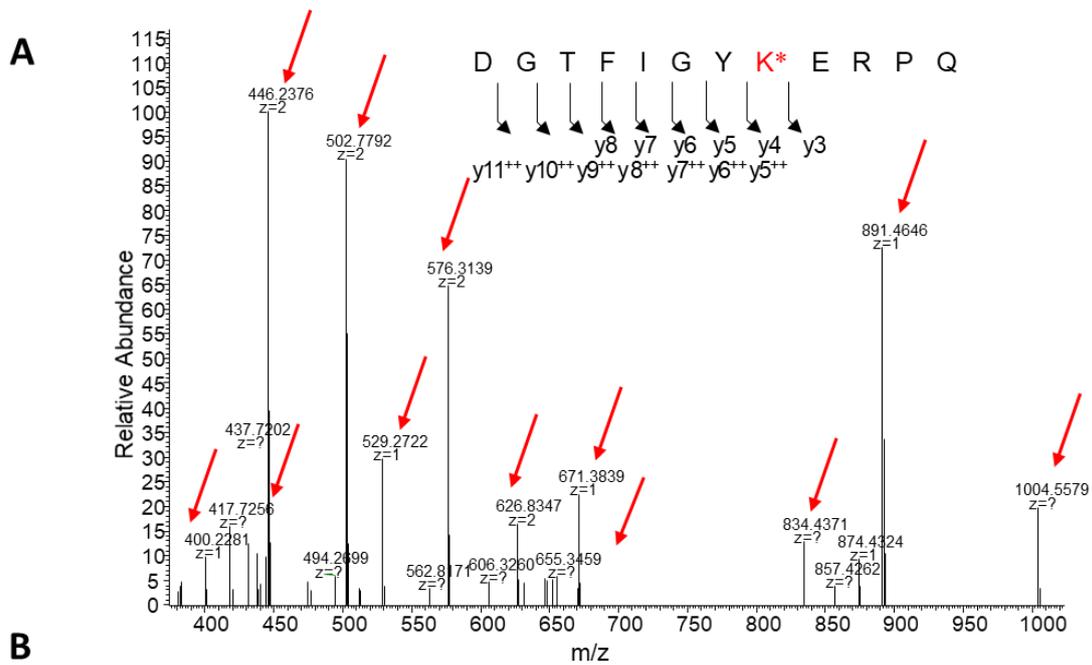
A. SAM の存在下に AKT1 組み換えタンパク質と異なる量の SMYD3 とを反応させ、オートラジオグラフィーでメチル化シグナルを同定した (上段)。各タンパク質は MemCode™ Reversible Stain による染色で可視化した (下段)。**B.** モノメチル化された AKT1 フラグメント (コドン 9-15) の LC-MS/MS スペクトラム (実測値)。矢印は Lys 14 のメチル化されたフラグメントの理論値と一致するピーク。**C.** AKT1 フラグメント (コドン 9-15) の MS/MS によるフラグメント質量の理論値 (予測値)。左は Lys 14 非メチル化フラグメント、右は Lys 14 モノメチル化フラグメント。b イオン (b) と y イオン (y)、右肩の ++ は価数を示す。図 2B で観察されたメチル化されたフラグメントイオンは赤字で記した。



#	b	b ⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	#	#	b	b ⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	#
1	164.071	82.539	Y			14	1	164.071	82.539	Y			14
2	311.14	156.073	F	1515.82	758.414	13	2	311.14	156.073	F	1529.84	765.422	13
3	424.224	212.615	L	1368.75	684.88	12	3	424.224	212.615	L	1382.77	691.888	12
4	537.308	269.157	L	1255.67	628.338	11	4	537.308	269.157	L	1269.68	635.346	11
5	665.403	333.205	K	1142.59	571.796	10	5	679.418	340.213	K	1156.6	578.804	10
6	779.446	390.226	N	1014.49	507.748	9	6	793.461	397.234	N	1014.49	507.748	9
7	894.473	447.74	D	900.447	450.727	8	7	908.488	454.748	D	900.447	450.727	8
8	951.494	476.251	G	785.42	393.214	7	8	965.51	483.258	G	785.42	393.214	7
9	1052.54	526.774	T	728.398	364.703	6	9	1066.56	533.782	T	728.398	364.703	6
10	1199.61	600.309	F	627.351	314.179	5	10	1213.63	607.317	F	627.351	314.179	5
11	1312.69	656.851	I	480.282	240.645	4	11	1326.71	663.859	I	480.282	240.645	4
12	1369.72	685.361	G	367.198	184.103	3	12	1383.73	692.369	G	367.198	184.103	3
13	1532.78	766.893	Y	310.177	155.592	2	13	1546.8	773.901	Y	310.177	155.592	2
14			K	147.113	74.06	1	14			K	147.113	74.06	1

図 3. SMYD3 による AKT1 の Lys 30 におけるメチル化

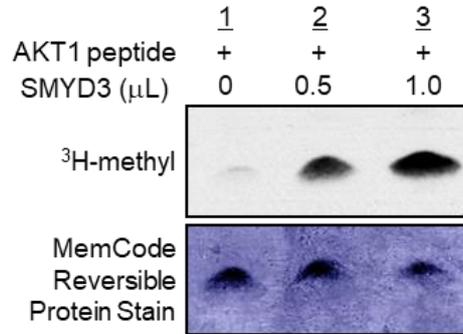
A. モノメチル化された AKT1 フラグメント (コドン 26-39) の LC-MS/MS スペクトラム (実測値)。矢印は Lys 30 のメチル化されたフラグメントの理論値と一致するピーク。B. AKT1 フラグメント (コドン 26-39) の MS/MS によるフラグメント質量の理論値 (予測値)。左は Lys 30 非メチル化フラグメント、右は Lys 30 モノメチル化フラグメント。b イオンと y イオン、右肩の ++ は価数を示す。図 3A で観察されたメチル化されたフラグメントイオンは赤字で記した。



#	b	b ⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	#	#	b	b ⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	#
1	116.035	58.521	D			12	1	116.035	58.521	D			12
2	173.056	87.032	G	1295.68	648.341	11	2	173.056	87.032	G	1309.69	655.349	11
3	274.104	137.556	T	1238.65	619.83	10	3	274.104	137.556	T	1252.67	626.838	10
4	421.172	211.09	F	1137.61	569.306	9	4	421.172	211.09	F	1151.62	576.314	9
5	534.256	267.632	I	990.537	495.772	8	5	534.256	267.632	I	1004.55	502.78	8
6	591.278	296.143	G	877.453	439.23	7	6	591.278	296.143	G	891.469	446.238	7
7	754.341	377.674	Y	820.432	410.72	6	7	754.341	377.674	Y	834.447	417.727	6
8	882.436	441.722	K	657.368	329.188	5	8	896.452	448.73	K	671.384	336.196	5
9	1011.48	506.243	E	529.273	265.14	4	9	1025.49	513.251	E	529.273	265.14	4
10	1167.58	584.294	R	400.231	200.619	3	10	1181.6	591.301	R	400.231	200.619	3
11	1264.63	632.82	P	244.13	122.569	2	11	1278.65	639.828	P	244.13	122.569	2
12			Q	147.077	74.042	1	12			Q	147.077	74.042	1

図 4. SMYD3 による AKT1 の Lys 39 におけるメチル化

A. モノメチル化された AKT1 フラグメント (コドン 33 -43) の LC-MS/MS スペクトラム (実測値)。矢印は Lys 39 のメチル化されたフラグメントの理論値と一致するピーク。B. AKT1 フラグメント (コドン 33-43) の MS/MS によるフラグメント質量の理論値 (予測値)。左は Lys 39 非メチル化フラグメント、右は Lys 39 モノメチル化フラグメント。b イオンと y イオン、右肩の ++ は価数を示す。図 4A で観察されたメチル化されたフラグメントイオンは赤字で記した。

A**B**

	K14	K30	K39
<i>Homo sapiens</i>	GWLH K RGEYIKTWRPRYFLL K NDGTFIGY K ERPQD		
<i>Bos taurus</i>	GWLH K RGEYIKTWRPRYFLL K NDGTFIGY K ERPQD		
<i>Mus musculus</i>	GWLH K RGEYIKTWRPRYFLL K NDGTFIGY K ERPQD		
<i>Merops rubicus</i>	GWLH K RGEYIKTWRPRYFLL K NDGTFIGY K ERPQD		
<i>Xenopus laevis</i>	GWLH K RGEYIKTWRPRYFLL K NDGTFIGY K ERPQD		
<i>Danio rerio</i>	GWVQ K RGEYIKNWRPRYFLL K TDGSFIGY K EKPQD		
<i>Drosophila melanogaster</i>	GWLM K RGEHIKNWRQRYFVLHSDGRLIGYR SKPAD		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	GWLH K KGEHIRNWRPRYFMI FNDGAL LGFR AKPKE		

図 5. AKT1 ペプチドでの SMYD3 によるメチル化

A. 10-44 AKT1 ペプチドを SMYD3 と反応させた。オートラジオグラフィーでメチル化シグナルを同定 (上段)、タンパク質は MemCode™ Reversible Stain による染色で可視化した (下段)。 **B.** 10-44 AKT1 のアミノ酸配列 (Thermo Fisher Scientific, P2999 データシートより引用)。Lys 14 と Glu 17 は異なる種間で広く保存されていることが判明した。

SMYD3 による Lys 14 での AKT1 メチル化と Thr 308 におけるリン酸化の関係

メチル化部位が存在することが判明した PH ドメインは、細胞膜に存在するリン脂質であるフォスファチジルイノシトール 3 リン酸との結合において重要なドメインであり、また AKT1 タンパク質は膜上に局在することで活性化することが知られている[43]。以上の事実から、SMYD3 による Lys 14、30、39 のメチル化ががん細胞における AKT1 の活性化に及ぼす影響に着目した。メチル化部位のリジンをアラニン (Alanine: A, Ala) に置換した発現ベクターを用意し、野生型のベクターとともに 293T 細胞に遺伝子導入して免疫沈降したサンプルを用いて Thr 308 におけるリン酸化レベルを比較したところ、Lys 14 を Ala に置換した AKT1 においてリン酸化レベルの著明な低下を認めた (図 6A)。また、Lys 39 の Ala への置換によってもリン酸化レベルは低下したが、Lys 30 の Ala への置換では全く変化が見られなかった (図 6A)。SMYD3 によるメチル化の Thr 308 におけるリン酸化への影響、その機序を解明するためにタンパク質の立体構造解析を行った。その結果、リン酸化部位である Thr 308 と、3 つのメチル化部位のそれぞれの距離は、15.8 Å、30.5 Å、22.7 Å であり、立体構造上距離が近接していることが明らかになった (図 6B)。AKT1 タンパク質の X 線結晶構造解析によって、Lys 14 のアミノ基の側鎖は Glu 17 のカルボキシル基の側鎖と水素結合をしており、その Glu 17 は Thr 308 が位置する活性化ループと Van der Waals 接触を

していることが判った (図 6C)。また、Lys 39 とアスパラギナーゼ 324 (Asp 324) は 3.89 Å の距離にあり、これらも Van der Waals 接触の関係であり、かつ静電引力が両者の側鎖に働いていることが立体構造解析から判明した (図 6D)。

以降の実験では、Lys 14 におけるメチル化が AKT1 の Thr 308 におけるリン酸化レベルに最も強く影響していることから、Lys 14 のメチル化に焦点を当てて機能解析を進めた。

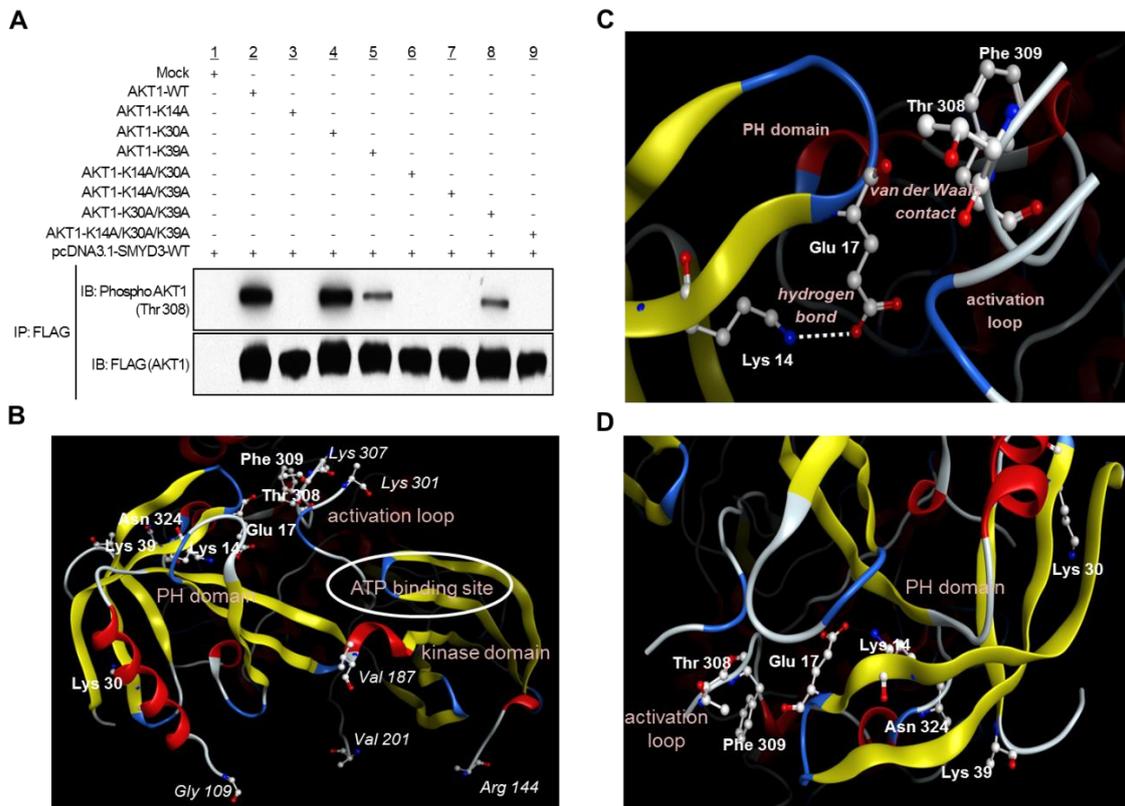


図 6. SMYD3 による Lys 14 における AKT1 タンパク質のメチル化は AKT1 活性化に重要

A. 293T 細胞に野生型 FLAG-AKT1 (AKT1-WT) もしくは置換型 FLAG-AKT1 (AKT1-K14A、AKT1-K30A、AKT1-K39A、AKT1-K14A/K30A、AKT1-K14A/K39A、AKT1-K30A/K39A、AKT1-K14A/K30A/K39A)ベクターを SMYD3 発現ベクターと共に遺伝子導入し、48 時間後に 100 ng/ml の EGF で 5 分間刺激した後にタンパク質を抽出、抗 FLAG 抗体で免疫沈降して得られたサンプルをウェスタンブロットした。**B.** AKT1 タンパク質の立体構造解析は Protein Data Bank (entry code, 4EJN)を元に行った[34]。PH ドメイン、活性化ループ (activation loop)、リン酸化ドメイン (kinase domain)、ATP 結合部位 (ATP binding site)を示している。**C.** AKT1 タンパク質の立体構造。メチル化部位である Lys 14 は Glu 17 と水素結合 (hydrogen bond)しており、Glu 17 は活性化ループと Van der Waals 接触の関係にある。**D.** PH ドメイン上の Lys 14、Lys 30、Lys 39 と活性化ループの位置関係を示した。

***In vivo* での Ly14 におけるメチル化の証明**

AKT1 における Lys 14 のモノメチル化に対する特異的な抗体 (抗 K14 モノメチル化 AKT1 抗体) を作成し、ELISA 試験 (図 7A 及び B) と、*in vitro* methyltransferase assay に続くウェスタンブロットによってその抗体の特異性が高いことがわかった (図 7C)。続いて、SMYD3 による AKT1 のメチル化と、AKT1 のリン酸化との関連性を検討するために図 7D の実験を行った。野生型 AKT1 (AKT1-WT)、もしくは Lys 14 を置換した AKT1-K14A と AKT1-K14R ベクターを、SMYD3 発現ベクター (SMYD3-WT) もしくは酵素活性を欠失させた SMYD3 発現ベクター (SMYD3 Δ EEL) とを 293T 細胞に遺伝子導入し、免疫沈降して得たサンプルでウェスタンブロットを行ったところ、SMYD3 Δ EEL を共発現させたサンプルと比較して、SMYD3-WT を共発現させたサンプルでメチル化シグナル、リン酸化シグナルともに増強を認めた (図 7D)。

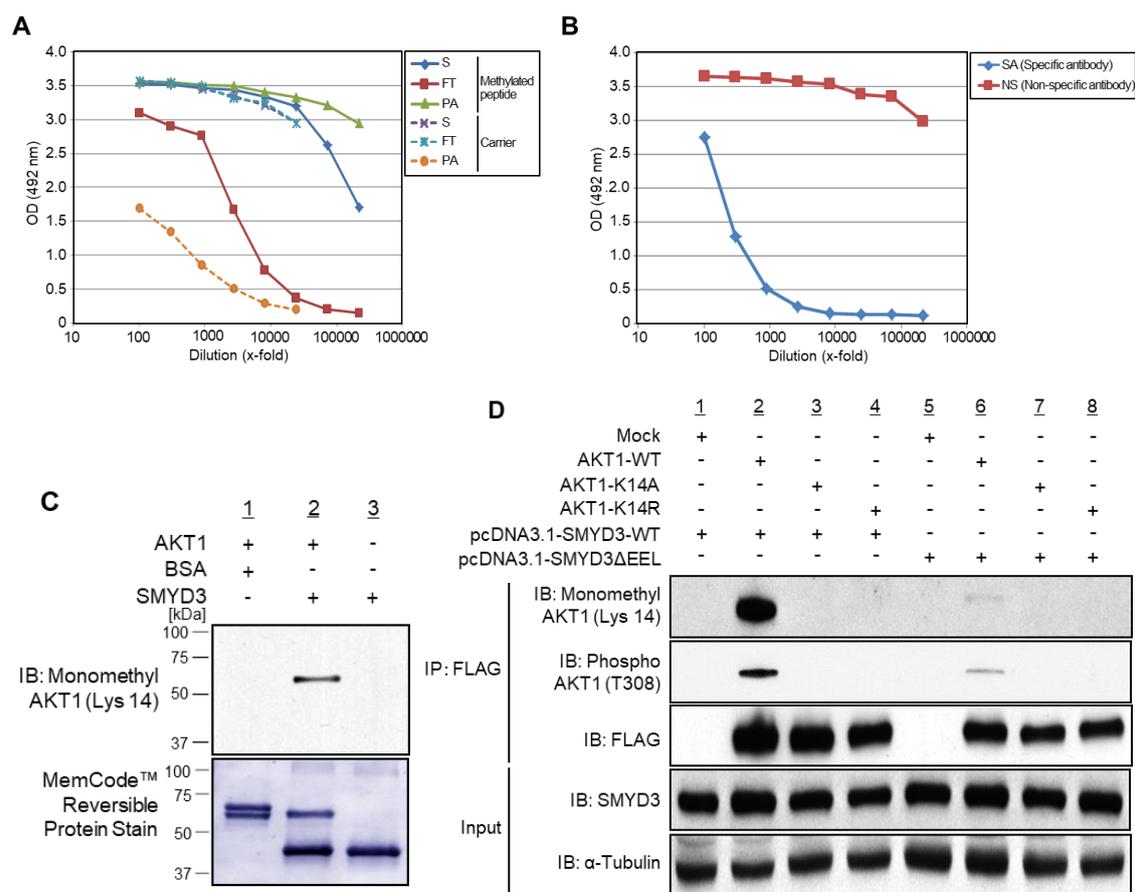


図 7. Lys14 における AKT1 メチル化特異的抗体の検証

A. 抗 K14 モノメチル化 AKT1 抗体の ELISA 試験。Lys 14 モノメチル化修飾を含んだ合成ペプチドをウサギに免疫させて、合成メチル化ペプチドに対しての親和性精製を行った。血清 (S)、フロースルー (FT)、精製抗体 (PA) を使用した。

B. 特異抗体 (SA) と非特異的抗体 (NS) を非修飾ペプチドに対しての ELISA 試験。

C. AKT1 と BSA、SMYD3 を組み合わせてメチル化反応させたサンプルで、抗 K14 モノメチル化 AKT1 抗体を用いてウェスタンブロットを行った (上段)。各タンパク質を MemCode™ Reversible Stain による染色で可視化した (下段)。SMYD3 と AKT1 を反応させた場合のみにシグナルが認められ、タンパク質のメチル化が同定された。

D. 293T 細胞に各発現ベクターを遺伝子導入した。48 時間後に 100 ng/ml の EGF で 5 分間刺激し、抽出したタンパク質サンプルに対して抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットを行った。

Lys14 における SMYD3 による AKT1 メチル化と AKT シグナル経路

AKT シグナル経路における SMYD3 の生物学的重要性を Loss-of-functional analysis によって検討した。大腸がん細胞株の SW480 細胞、乳がん細胞株の MDA-MB-231 細胞に対して siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンさせて、AKT1 の Thr 308 におけるリン酸化レベルと AKT シグナル経路の下流遺伝子である mTOR の Ser 2448 におけるリン酸化レベルへの影響を調べた。その結果、SMYD3 のノックダウンによって Lys 14 におけるメチル化レベルと、AKT1 のリン酸化レベル、同様に mTOR のリン酸化レベルがコントロールと比較して有意な低下を認めた (図 8A-D)。次に SMYD3 阻害剤である BCI-121[35]を用いて、AKT1 の活性化への影響を調べた。siRNA の実験に使用した同じ細胞株に対して BCI-121 を投与し、AKT1 のメチル化、リン酸化レベルを比較した。結果は、BCI-121 の投与によって AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベルの低下を認め、またそれらのレベルの低下は BCI-121 用量依存的に認められた (図 9A-D)。

次に、Gain-of-functional analysis として 293T 細胞と HeLa 細胞に AKT1-WT と共に Mock もしくは SMYD3 発現ベクターを共発現させ、48 時間の培養の後に得られたサンプルでウェスタンブロットを行った。図 10A-D で示すように、SMYD3 を過剰発現させた両細胞のサンプルにおいて、AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベル、mTOR のリン酸化レベルの上昇を認めた。

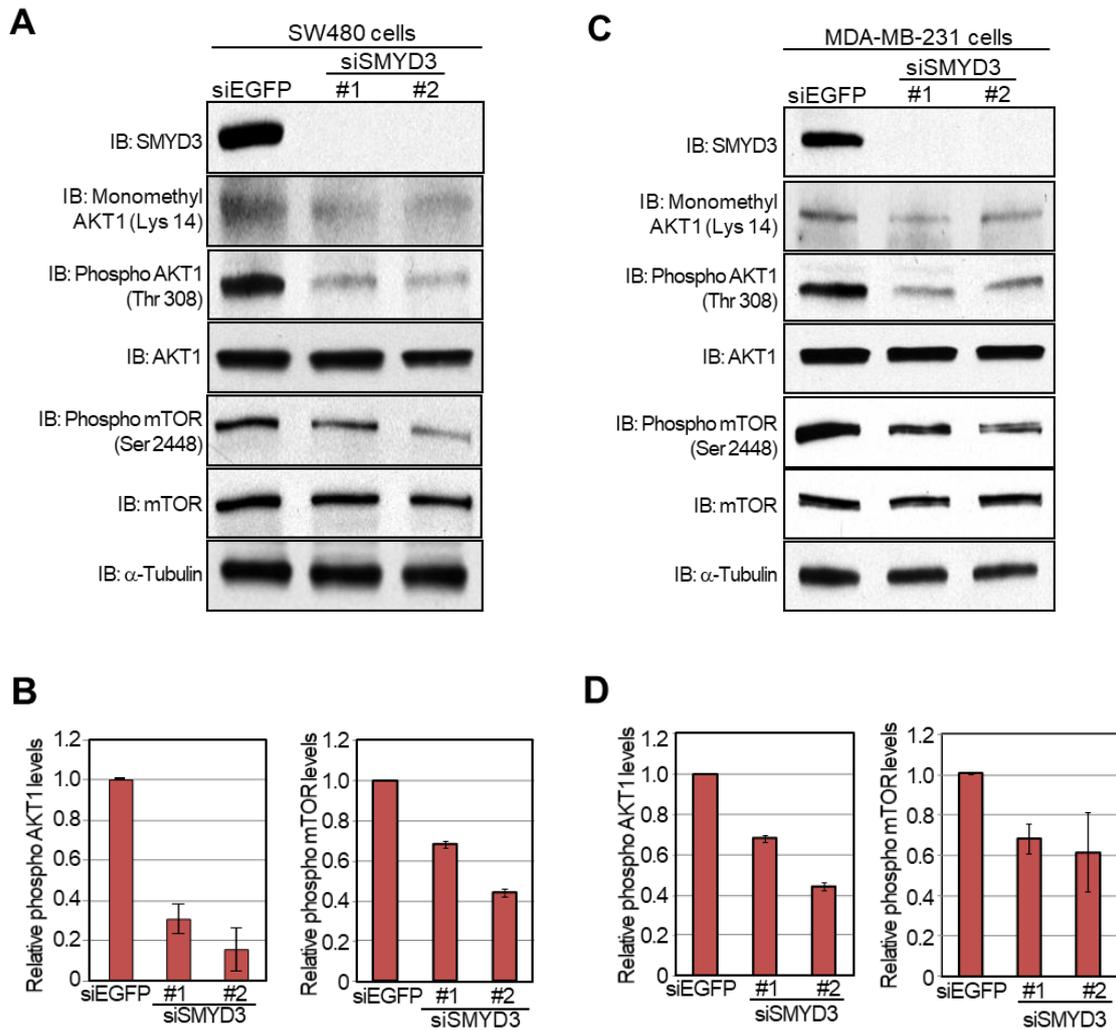


図 8. SMYD3 ノックダウンによる AKT1 活性への影響

A, C. SW480 細胞、MDA-MB-231 細胞に対して siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンし 72 時間の培養の後 100 ng/ml の EGF で 5 分間刺激し、タンパク質を抽出しウェスタンブロットを行った。AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベル、AKT1 の下流遺伝子 mTOR の Ser 2448 でのリン酸化レベルが SMYD3 のノックダウンによってコントロール (siEGFP) と比較して減弱した。**B, D.** 各 X 線フィルムを GS-800™ calibrated densitometer (Bio-Rad) でスキャンし、AKT1、mTOR のリン酸化シグナル濃度を各タンパクレベルで標準化しグラフ化した。

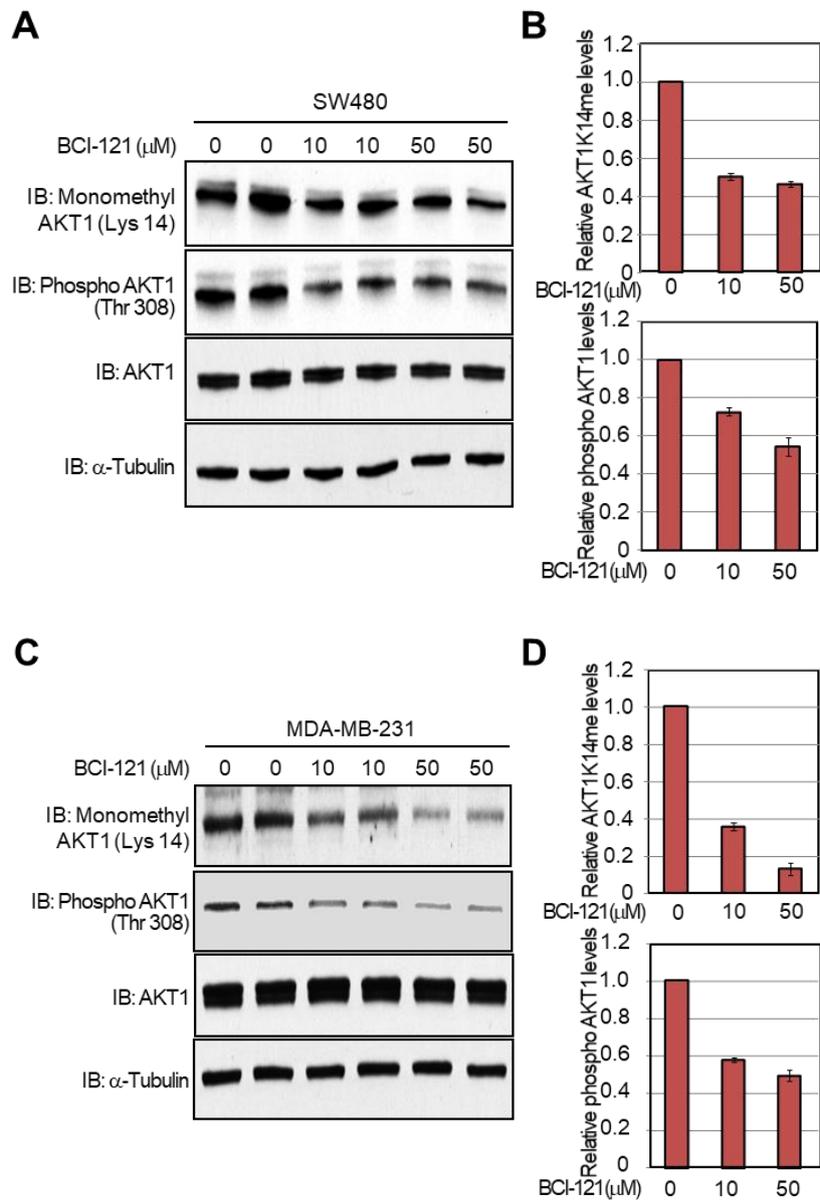


図 9. SMYD3 酵素活性阻害の AKT1 活性への影響

A, B. SW480 細胞、MDA-MB-231 細胞を 0, 10, 50 μM の BCI-121 で 72 時間処理した後に 100 ng/ml の EGF (SW480) もしくは NRG1 (MDA-MB-231) で 5 分間刺激し、タンパク質を抽出しウェスタンブロットを行った。AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベルは BCI-121 の用量依存的に減弱した。**C, D.** 各 X 線フィルムを GS-800™ calibrated densitometer (Bio-Rad) でスキャンし、AKT1 のリン酸化、メチル化のシグナル濃度を AKT1 タンパクレベルで標準化しグラフ化した。

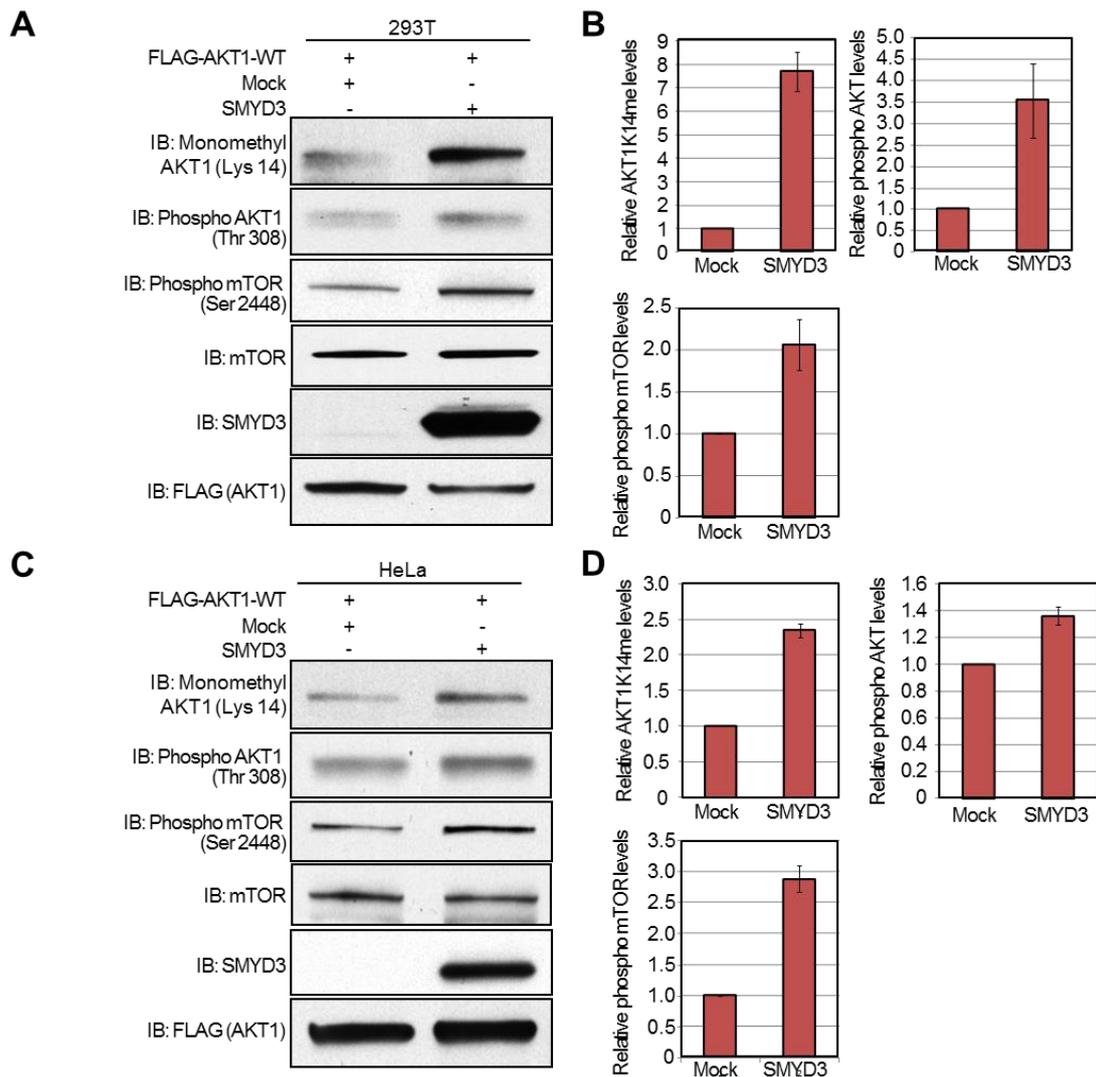


図 10. SMYD3 の過剰発現は AKT1 シグナル経路を活性化させる

A, C. 293T 細胞 (A)と HeLa 細胞 (B)に Mock もしくは SMYD3 発現ベクターを野生型 FLAG タグ付き AKT1 ベクターとともに遺伝子導入した。48 時間の培養の後 100 ng/ml の EGF で 5 分間刺激し、タンパク質を抽出してウェスタンブロットを行った。AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベル、下流遺伝子の mTOR のリン酸化レベルが、SMYD3 の過剰発現により増強した。**B, D.** 各 X 線フィルムを GS-800™ calibrated densitometer (Bio-Rad)でスキャンし、AKT1 のリン酸化、メチル化、mTOR のリン酸化シグナル濃度を各タンパクレベルで標準化しグラフ化した。

SMYD3 による Lys 14 のメチル化と AKT1 タンパク質の細胞膜への集積と細胞増殖能への影響

以前、Carpen らによって Glu 17 の Lysine への変異が非小細胞肺がんで発見され、この変異によって AKT1 タンパク質の細胞膜への接着が増強され、AKT1 の恒常的な活性化を引き起こすことが示唆された[44]。この報告と、先に示した構造解析により Lys 14 は Glu 17 と水素結合の関係にあることから、メチル化が同様に細胞膜への接着に寄与する可能性があると考えられた。HeLa 細胞に AKT1-WT もしくは AKT1-K14A を SMYD3 発現ベクターとともに過剰発現させて、免疫細胞染色にて細胞内のタンパク質の局在を調べたところ、野生型 AKT1 は主に細胞膜に局在しているのに対し、メチル化部位を置換した AKT1 は野生型のような細胞膜への強い局在を認めなかった (図 11A 及び B)。次に、同じ条件で準備した細胞から細胞膜のタンパク質を抽出してウェスタンブロットを行ったところ、置換型の AKT1 は野生型に比べて明らかに少ないことが判明した (図 11C)。最後に、SMYD3 によるメチル化の AKT1 の腫瘍形成に関する活性に対する寄与を検討するために、恒常的に AKT1-WT もしくは AKT1-K14A を過剰発現する形質転換細胞 SW480 を用意し、細胞増殖アッセイを行い比較した。置換型 AKT1 を発現する SW480 細胞が、野生型に比べて有意に低い増殖能を示し (図 12A)、同じサンプルを用いた細胞周期解析では置換型 AKT1 発現細胞において、

S 期にある細胞数の有意な減少を示した (図 12B 及び C)。また、同サンプルを用いたウェスタンブロットでは、それぞれのサンプルの外来性 AKT1 の発現量はほぼ等しいものの、置換型 AKT1 発現細胞においては AKT1 リン酸化レベルが有意に低いことが確認された (図 13)。

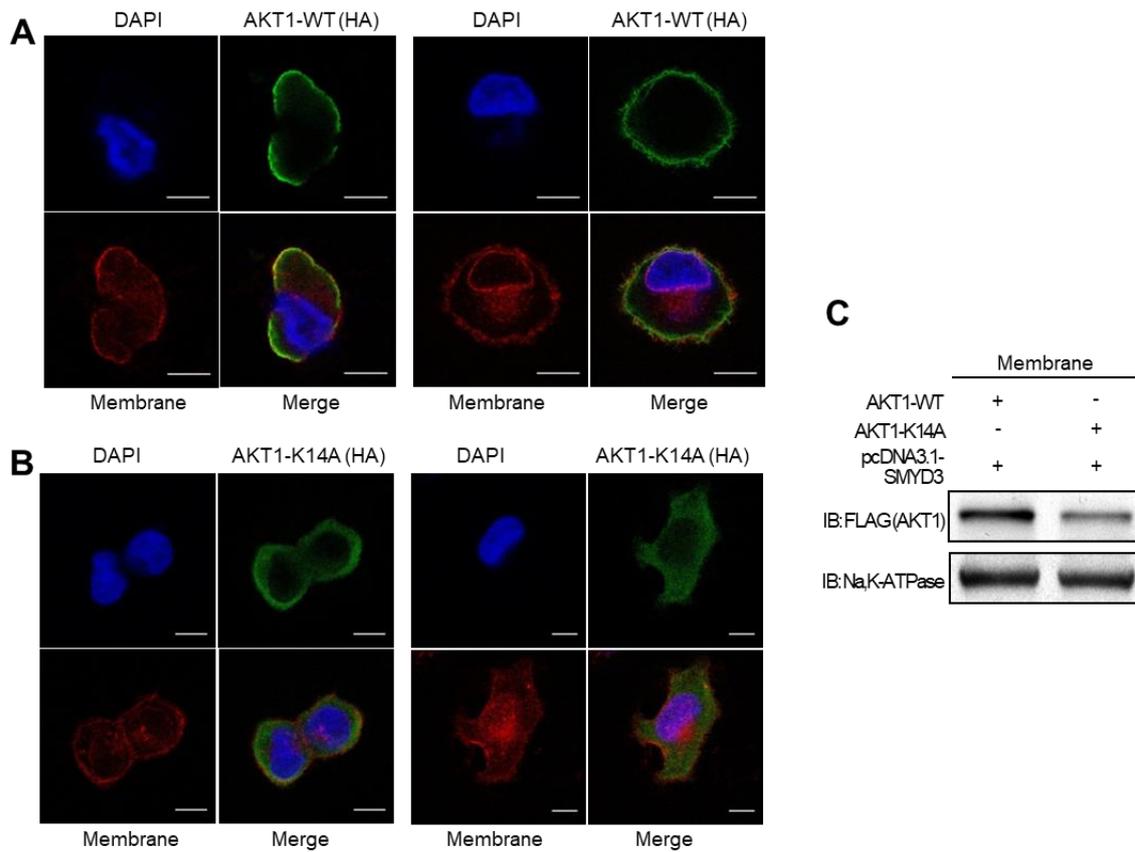


図 11. Lys 14 におけるメチル化は細胞膜への AKT1 集積を促進させる

A, B. HeLa 細胞に野生型 AKT1 発現ベクター (HA-AKT1-WT) もしくは K14A 置換型 AKT1 発現ベクター (HA-AKT1-K14A) を SMYD3 発現ベクターとともに遺伝子導入し 48 時間後に撒き直し、その 24 時間後に 100 ng/ml の EGF で 5 分間刺激した後、抗 HA 抗体 (緑色) と WGA 抗体 (赤色)、DAPI (青色) を用いて免疫細胞染色した。スケールバーは 10 μ m。 **C.** 免疫細胞染色と同様の条件で準備した HeLa 細胞の膜タンパクを Mem-PER™ plus membrane protein extraction kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出し、ウェスタンブロットを行った。

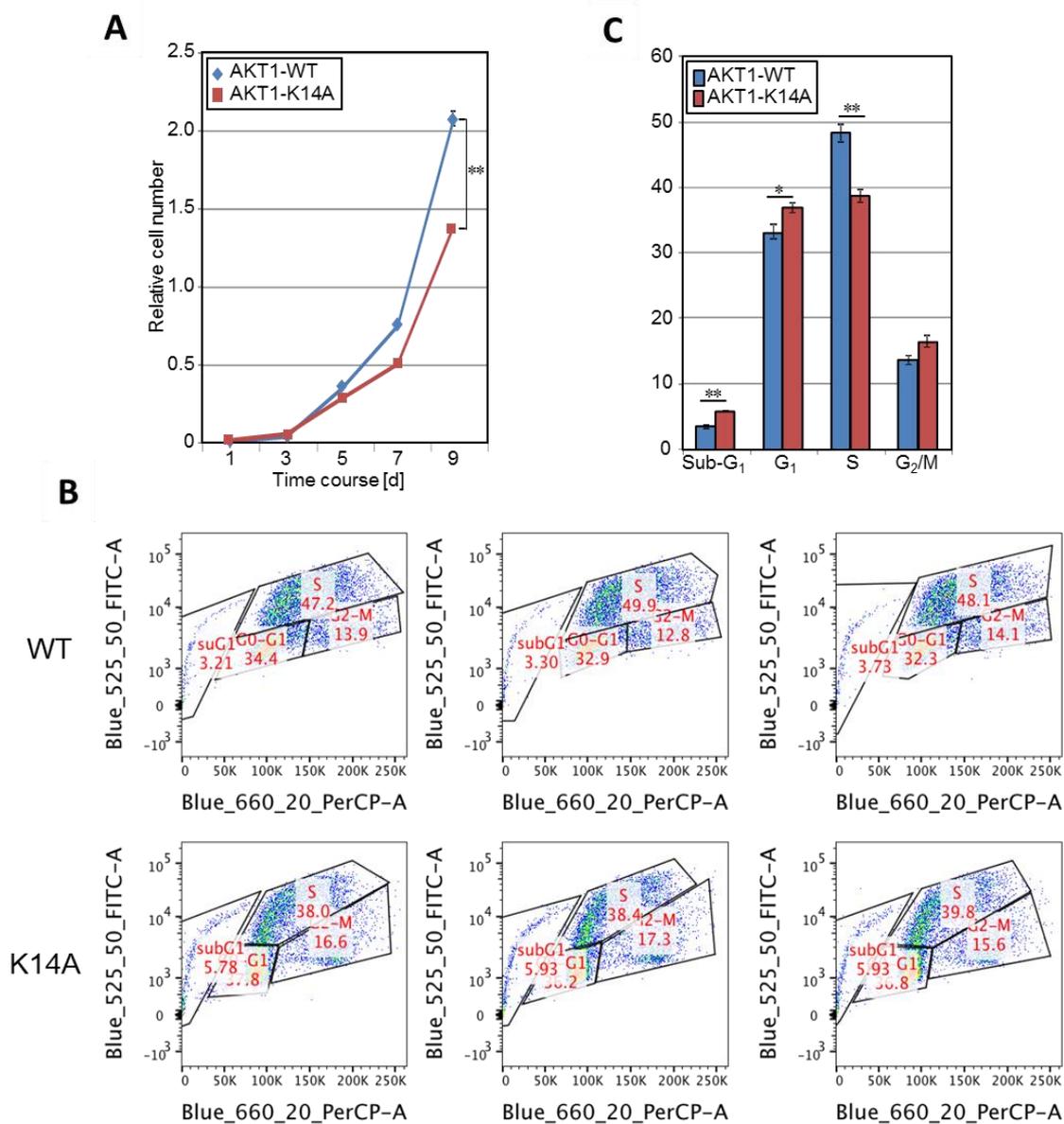


図 12. Lys 14 におけるメチル化の細胞増殖能への影響

A. 細胞増殖アッセイ。野生型 AKT1 (AKT1-WT)もしくは変異型 AKT1 (AKT1-K175A)を過剰発現する SW480 細胞株を準備し、CCK8 (Dojindo)を用いて細胞数をカウントした。野生型、変異型、それぞれ 3 クローンずつ細胞株を用いて実験を行った。** $P < 0.01$ B, C. A と同じ細胞株を使用した細胞周期アッセイ。野生型と置換型、それぞれ 3 クローンずつ細胞株を用いて実験を行った。B に FACS の生データを示す。C は B のデータをグラフ化したもの。** $P < 0.01$

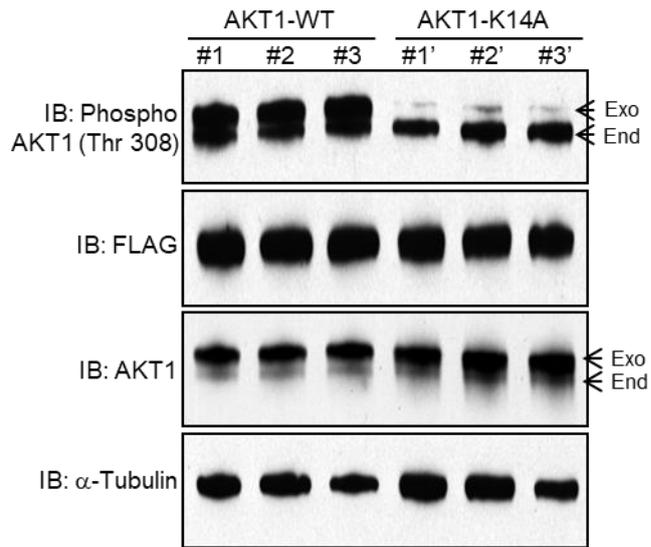


図 13. 形質転換細胞 SW480 における Thr 308 でのリン酸化レベル

図 12 で用意した形質転換細胞 SW480 を用いたウェスタンブロット。細胞内由来の AKT1 を Endo、細胞外由来の AKT1 を Exo と表記した。置換型 AKT1 は野生型 AKT1 と比較して Thr 308 において低いリン酸化レベルを示した。

4. 考察

AKT シグナル経路は様々ながんにおいて、細胞増殖の調整、分化、血管新生などにおいて重要な役割を果たすとされている[45]。その中心である AKT1 の活性化は Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 依存的な 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) と mTOR Complex 2 (mTORC2) によるリン酸化が最初の契機と長く考えられてきたが、PI3K/Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN) が正常レベルの中で AKT1 経路が過剰に活性化する機序は不明なままであった[29]。本研究によって、タンパク質メチル基転移酵素 SMYD3 が *in vitro*、*in vivo* 両条件下に AKT1 の Lys 14 をモノメチル化することがわかった。またその他に Lys 30 と Lys 39 も SMYD3 によってモノメチル化されることがわかった (図 2-4)。これらのメチル化部位を含んだアミノ酸配列を生物種間で比較したところ、Lys 14 はヒトから線虫まで広く保存されていることがわかり、機能的な重要性が示唆された (図 5B) [46]。そしてメチル化部位の Lys を Ala に置換した AKT1 タンパク質を用意して、AKT1 活性化の重要なマーカーである Thr 308 でのリン酸化レベルを比較したところ、Lys 14 の置換体で著明なリン酸化レベルの低下が認められた (図 6A)。この結果から、Lys 14 におけるメチル化が、AKT1 の活性化に重要であることが示唆された。AKT1 タンパク質の立体構造解析では Lys 14 と Thr

308 が近接していること、さらには Lys 14 と Glu 17 が水素結合していること、その Glu 17 が Thr 308 を含んだ活性化ループと Van der Waals 接触をしていることが判明した (図 6C)。Lys 14 がメチル化されると、Lys 14 のアミノ基の側鎖の水素結合が、疎水性のメチル基に置換されるため、必然的に Lys 14 と Glu17 間の静電相互作用が減弱化する。結果的に、Glu 17 に関連した構造の自由度が増し活性化ループが開くことで、間接的に Thr 308 におけるリン酸化のしやすさに関与していると考えられた。また、この AKT1 活性化機序に関して、Lys 14 でのメチル化により細胞膜への AKT1 の集積が増加することが免疫細胞染色で判明した (図 11)。この結果に関しては Lys 14 の存在する PH ドメインが膜上のホスホイノシタイドと接着することで AKT1 が活性化されることは知られており、この Lys 14 が構造学的にフォスファチジルイノシトール 3 リン酸やフォスファチジルイノシトール 2 リン酸と相互作用することも報告されている[41]。リジンのメチル化は塩基性、疎水性を増加させる[47]。SMYD3 によるメチル化によって生じた PH ドメインでのこのような生化学的変化が、AKT1 とホスホイノシタイドとの結合親和性を増強させると考えられた。以上の結果から、SMYD3 による Lys 14 のメチル化は AKT1 の活性化を調整する鍵となることがわかった。

SMYD3 によるメチル化が AKT1 のリン酸化を促すことが図 6A をはじめとした実験で示唆されたが、siRNA や SMYD3 の酵素活性阻害剤を用いた Loss-of-

functional analysis (図 8 及び 9)と、SMYD3 を過剰発現させた Gain-of-functional analysis (図 10)による検討で、SMYD3 による Lys 14 でのメチル化が AKT1 のリン酸化、さらに下流の mTOR のリン酸化レベルに影響を及ぼすことが示され、置換体で示された表現型が正しい現象であることが証明できた。

近年、AKT の PH ドメインを標的とする抗がん治療薬の研究開発が進んでいる。例えば、アルキルリン脂質製剤であるペリフォジン、ミルテフォジンなどは AKT の PH ドメインに接着して膜への凝集を阻害するように設計された AKT 阻害剤である[43, 48, 49]。これらの分子の PH ドメインへの結合の結果、AKT のリン酸化レベルの上昇が阻害され、下流シグナルの活性化は抑制されることが報告されている。このように、我々の研究でメチル化部位が見つかった PH ドメインは機能上、がん治療の標的として重要な候補であると考えられる。SMYD3 特異的阻害剤である BCI-121 を用いた実験でも、AKT1 のメチル化レベルと共にリン酸化レベルは有意に低下しており (図 9)、また BCI-121 はがん細胞の増殖を妨げることが示されている[35]。細胞増殖能に関しては、形質転換細胞 SW480 を用いた我々の実験でも、置換体 AKT1 を過剰発現する細胞では野生型に比べて有意に細胞増殖能が低いこと (図 12)、またリン酸化レベルが低下することが示され、SMYD3 による Lys 14 でのメチル化が既存のシグナル経路を介して細胞増殖能に寄与していることが示唆された (図 13)。

以上より、SMYD3によるLys 14のメチル化は、SMYD3を過剰発現しているタイプのがん細胞において、AKT1活性化のトリガーになっていると考えられ、メチル基転移酵素 SMYD3 は抗がん治療の標的として良い候補であると考えられた。

第 2 章

メチル基転移酵素 SMYD3 と HER2 タンパク質のホモ 2 量体化の関係

1. 目的

HER2 タンパク質も AKT1 と同様、主要ながん遺伝子の一つであり、リン酸化が HER2 の下流シグナル経路の活性化に重要であることはよく知られている。今回、複数のメチル基転移酵素 (SMYD2、SMYD3、PRMT1、PRMT6)を用いた *in vitro* methyltransferase assay によって HER2 タンパク質がメチル基転移酵素 SMYD3 によってメチル化されることが明らかになったため、がんにおけるその役割を解明することを本研究の目的とした。

2. 実験材料および方法

1. 細胞培養

293T 細胞、HeLa 細胞、乳がん細胞株 MCF7 と ZR-75-1 は ATCC より購入したものを使用した。すべての細胞株は単層で 10% の FBS と 1% の抗生物質 (Sigma-Aldrich) が添加された以下の培養液で、培養した。293T 細胞は D-MEM、HeLa 細胞と MCF7 細胞は E-MEM、ZR-75-1 細胞は RPMI-1640 を使用した。遺伝子導入には FuGENE[®] HD (Promega) を使用し、メーカーの推奨プロトコールに従った[50]。

2. 抗体

1 次抗体は以下のものを使用した。

抗 FLAG 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, F7425; Sigma-Aldrich

抗 HA 抗体

1:1000 in ICC, ラットモノクローナル抗体, #11867423001; Roche Applied Science)

抗 SMYD3 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D2Q4V; Cell Signaling Technology

抗 HER2 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, 29D8; Cell Signaling Technology

抗リン酸化 HER2 (Tyr 1248)抗体

1:500 in WB, ウサギモノクローナル抗体, #2247; Cell Signaling Technology

抗 EGFR 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D38B1; Cell Signaling Technology

抗 ACTB 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, #4967; Cell Signaling Technology

抗ヒストン H3 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, ab1791; Abcam

抗 AKT 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, C67E7; Cell Signaling Technology

抗リン酸化 AKT (Ser 473)抗体

1:1000 in WB, マウスモノクローナル抗体, 587F11; Cell Signaling Technology

抗 PLC γ -1 抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D9H10; Cell Signaling Technology

抗リン酸化 PLC γ 1 (Tyr 783)抗体

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, #2821; Cell Signaling Technology
抗 p44/42 MAPK (Erk1/2)

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, #9102; Cell Signaling Technology
抗リン酸化 p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr 202/Tyr 204)

1:1000 in WB, ウサギモノクローナル抗体, D13.14.4E; Cell Signaling
Technology

3. *In vitro* methyltransferase assay

メチル化活性化バッファー (50 mM の Tris-HCl、10 mM の DTT と 10 mM の MgCl₂ の混合液)の存在下に、GST-HER2 組み換えタンパク質 (H00002064-P01, Novus biologicals)と SMYD3 酵素 (in house)、メチル基供与体である 2 μCi の SAM (PerkinElmer)を 30°C の恒温槽で 2 時間反応させた。タンパク質は Mini-PROTEAGEN[®] TGX[™] Precast gel (Any kD; Bio-Rad)上に分離され、EN3HANCE[™] Spray Surface Autoradiography enhancer (PerkinElmer)にてシグナルを増強させた上でフルオログラフィーにて可視化した。タンパク質の存在は MemCode[™] Reversible Stain (Thermo Fisher Scientific)を用いて可視化した。

4. 質量分析法

In vitro methyltransferase assay を行ったサンプルを SDS-PAGE で分離し、Simply Blue Safe Stain (Thermo Fisher Scientific)で染色した。HER2 のバンドはトリプシンとエンドプロテイナーゼ Asp-N を用いてゲル内にて分離、消化し、Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて LC-MS/MS にて解析した。ペプチドは 0-35%のバッファーB (100%アセトニトリルと 0.1%のギ酸の混合液)を用いて、300 nL/min の速度で 10 分以上かけて nano ESI spray column (Nikkyo Technos)によって分別した。質量分析計は陽イオンモードで、データ依存的な TOP10 法を用いて MS と MS/MS のスペクトラムを得た。その MS/MS スペクトラムを local MASCOT server (Version 2.5; Matrix Sciences)を使用したデータベースを基に調べた。この実験に関しては、理化学研究所の堂前直氏、鈴木健裕氏によって行われた。

5. タンパク質立体構造解析

HER2 タンパク質の立体構造解析は、オンコセラピーサイエンスの松尾洋氏によって Protein Data Bank (entry code, 3WLW)を元に行われた[51]。

6. ウェスタンブロッティング法

サンプルはプロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)を含んだ CelLytic™ M 溶液を用いて溶解した細胞より準備し、全ての細胞の溶解物や IP 産物などのサンプルはニトロセルロース膜に移された。タンパク質のバンドはホースラディッシュペルオキシダーゼ接合抗体 (GE Healthcare)と反応させ、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare)を用いて可視化した。

7. 免疫沈降

遺伝子導入された 293T 細胞と HeLa 細胞は、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)とフォスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)を含んだ CelLytic™ M 溶液を用いて溶解した。全細胞抽出物は抗 FLAG® M2 affinity gel (Sigma-Aldrich)ともしくは抗 HA アガロースと共に夜通し恒温放置した。PBS でビーズを 3 回洗浄した後に、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Sciences)を含んだ溶出液 (100 µg/ml の 3X FLAG® ペプチド (Sigma-Aldrich) もしくは HA ペプチド (Sigma-Aldrich))でビーズに付着したタンパク質を溶出させた。溶出したサンプルは Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific)と共に煮沸し、ウェスタンブロットに使用した。

8. siRNA 遺伝子導入と細胞増殖アッセイ

siRNA オリゴヌクレオチド 2 本鎖は、Sigma-Aldrich より購入した SMYD3 をターゲットとした siSMYD3 (SASI Hs01_00188121 及び SASI Hs01_00188125)を使用した。siNegative control (siNC)は 3 つの異なる配列を含んだ siRNA でコントロールとして使用している[52, 53]。siRNA の配列は表 2 に記載する。siRNA は最終濃度 100 nM で調整し、ZR-75-1、MCF7 に Lipofectamine[®] RNAiMax Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて遺伝子導入した。96 時間の培養の後に、細胞抽出物は NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞質のタンパク質と核内のタンパク質に分別した。

siRNA 名		配列
siNegative control (Cocktail)	Target#1	Sense: 5' AUCCGCGCGAUAGUACGUA 3' Antisense: 5' UACGUACUAUCGCGCGGAU 3'
	Target#2	Sense: 5' UUACGCGUAGCGUAAUACG 3' Antisense: 5' CGUAUUACGCUACGCGUAA 3'
siSMYD3#1	Target#3	Sense: 5' UAUUCGCGCGUAUAGCGGU 3' Antisense: 5' ACCGCUAUACGCGCGAAUA 3'
		Sense: 5' GAUUGAAGAUUUGAUUCUA 3' Antisense: 5' UAGAAUCAAUCUCAAUC 3'
siSMYD3#2		Sense: 5' CAGCAAUUCUGAACGGCUU 3' Antisense: 5' AAGCCGUUCAGAAUUGCUG 3'

表 2: siRNA 配列

3. 結果

SMYD3 による HER2 タンパク質の Lys 175 におけるメチル化

がん遺伝子である HER2 タンパク質がメチル基転移酵素によりメチル化されるか否かを、複数のメチル基転移酵素 (SMYD2、SMYD3、PRMT1、PRMT6) を用いた *in vitro* methyltransferase assay によるスクリーニングを行ったところ、SMYD3 の存在下のみメチル化シグナルが認められた。この結果を元に SMYD3 と HER2 を組み合わせた *in vitro* methyltransferase assay を行い、SMYD3 の存在下にメチル化シグナルが出現することを確認した (図 14A)。次に、メチル化部位の特定のために LC-MS/MS 解析を行った結果、SMYD3 の存在下でのみ Lys 175 を含むフラグメントイオンの実測 m/z 値が、フラグメントイオンの予測 m/z 値と比較して 42Da の相違が観察され、この部位で SMYD3 によってトリメチル化されることが明らかになった (図 14B 及び C)。なお Lys 175 に関しては、ユビキチン化されることが報告されているが、モノユビキチン化なのかポリユビキチン化なのかさえ判明しておらず、機能解析の報告もこれまでなかった [54]。

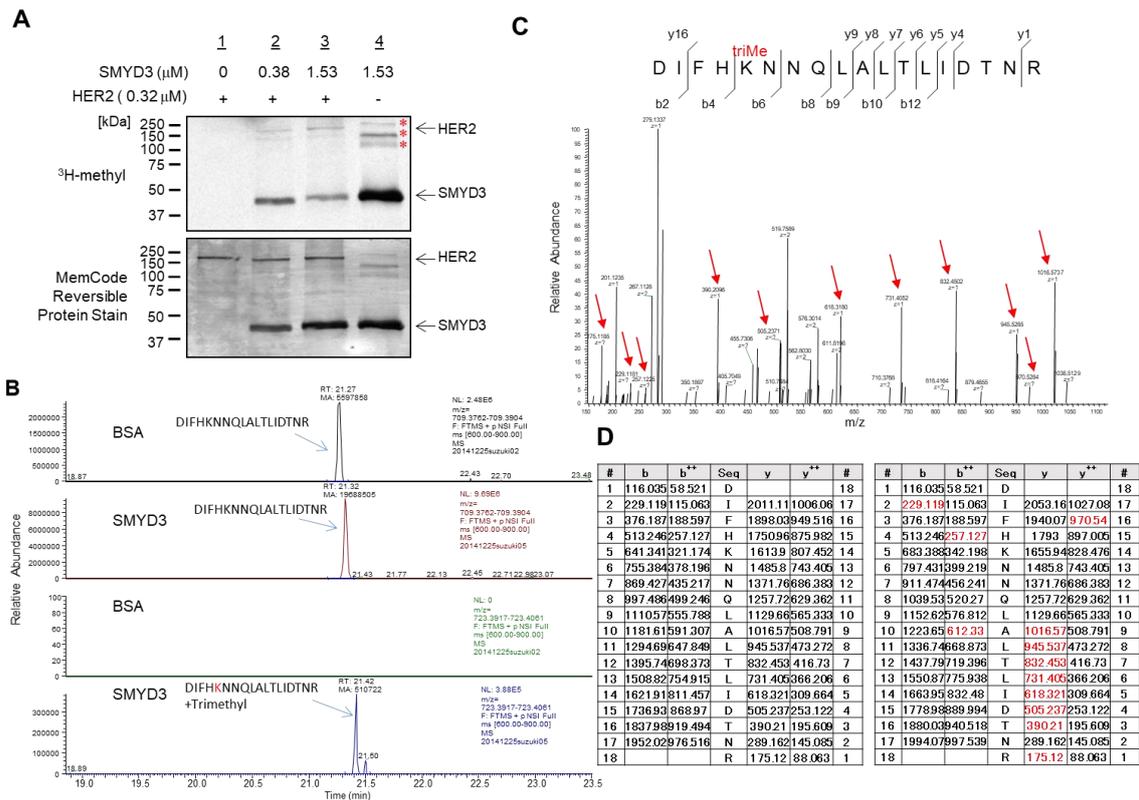


図 14. SMYD3 は HER2 を Lys 175 にてトリメチル化する

A. HER2 の *in vitro* methyltransferase assay. SAM の存在下に HER2 組み換えタンパク質と異なる量の SMYD3 とを反応させ、オートラジオグラフィーでメチル化シグナルを同定した (上段)。各タンパク質は MemCode™ Reversible Stain による染色で可視化した (下段)。メチル化シグナルの SMYD3 容量依存的な増強が認められた。*SMYD3 オートメチル化による非特異的シグナル。**B.** 非修飾の 171-188 HER2 フラグメントとトリメチル化された 171-188 HER2 フラグメントの MS クロマトグラム。SMYD3 の存在下でのみ、トリメチル化されたペプチドが認められた。**C.** トリメチル化された HER2 フラグメント (コドン 171-188) の LC-MS/MS スペクトラム (実測値)。矢印は Lys 175 のメチル化されたフラグメントの理論値と一致するピーク。**D.** HER2 フラグメント (コドン 171-188) の MS/MS によるフラグメント質量の理論値 (予測値)。左は Lys 175 非メチル化フラグメント、右は Lys 175 トリメチル化フラグメント。b イオンと y イオン、右肩の ++ は価数を示す。図 14C で観察されたメチル化されたフラグメントイオンは赤字で記した。

SMYD3 による Lys 175 のメチル化と、HER2 のリン酸化レベルとの関係

乳がん細胞株 (ZR-75-1 と MCF7) に対して siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンし HER2 のリン酸化レベルを比較したところ、siSMYD3 を遺伝子導入された細胞株では、コントロール (siNC) に比してリン酸化レベルの低下を認めた (図 15A 及び B)。次に、この現象を説明するために立体構造解析を行った。細胞外ドメインは構造的に4つのドメインにより構成されており、それぞれ ECD I、ECD II、ECD III、ECD IV と呼ばれている。このうち、ECD II は HER2 タンパク質の 2 量体形成において接合部として知られている。この ECD II にある Glycine 223 (Gly 223) の主鎖のカルボニル基が ECD I に存在する Lys 175 の側鎖のアミノ基と水素結合していることがわかった (図 15C)。

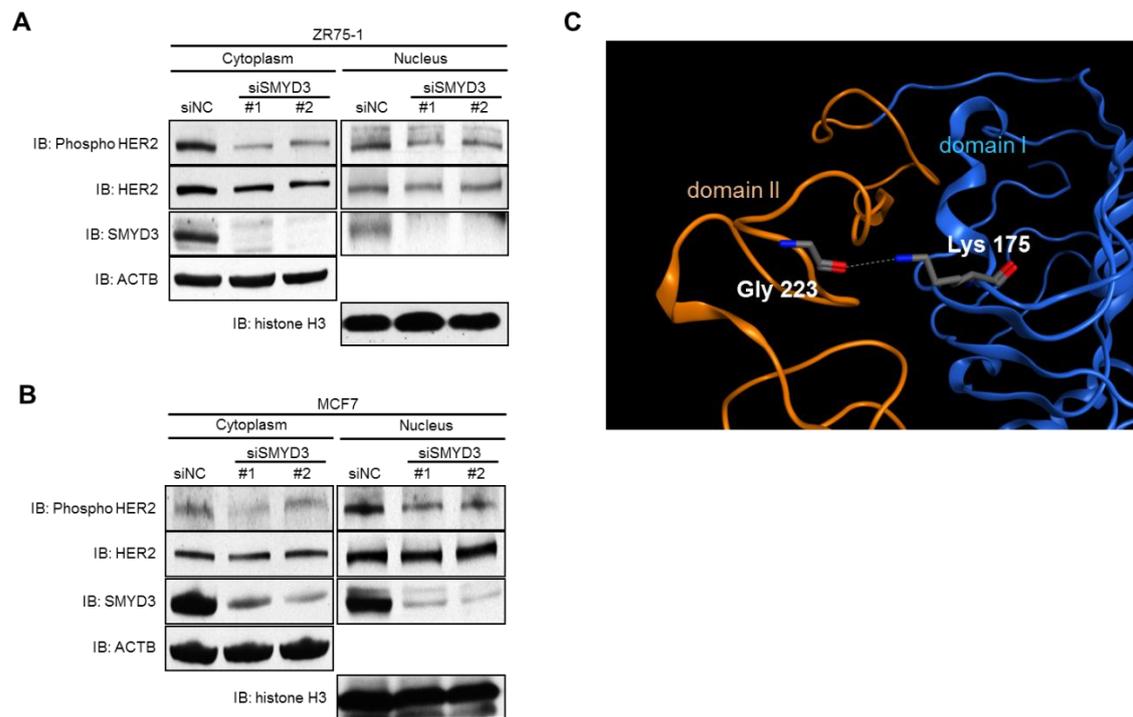


図 15. SMYD3 のノックダウンは HER2 のリン酸化レベルを減弱させる

A、B. コントロールの siNC、siSMYD3 (#1 と#2)を乳がん細胞株 ZR-75-1 (A)と MCF7 (B)に遺伝子導入し、タンパク質を抽出、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific)を用いて核内タンパク質と細胞質タンパク質に分画し、ウェスタンブロットにて HER2 のリン酸化レベルをそれぞれ比較した。C. HER2 タンパク質細胞外ドメインの立体構造解析。ECD I は青。ECD II はオレンジで示される。ECD I に存在する Lys 175 の側鎖のアミノ基が ECD II に存在する Gly 223 の主鎖のカルボニル基と水素結合している。HER2 タンパク質の立体構造解析は Protein Data Bank (entry code, 3WLW)を元に行った[51]。

SMYD3 による Lys 175 のメチル化と、HER2 ホモ 2 量体化形成との関係

HeLa 細胞に FLAG-tagged HER2 (FLAG-HER2) と、HA-tagged HER2 (HA-HER2) を mock もしくは SMYD3 発現ベクターとともに共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったサンプルを用いてウェスタンブロットを行った。SMYD3 を過剰発現させた細胞において、EGF 刺激の有無に関わらず、共免疫沈降された HA-HER2 がコントロールに比して著明に増加していることが判明した (図 16A)。対照的に、共免疫沈降された EGFR は SMYD3 の有無に関わらず一定であった。以上より、SMYD3 によるメチル化はホモ 2 量体形成に影響するが、ヘテロ 2 量体形成には関与しないと考えられた。この結果を確認するために、メチル化部位である Lys 175 をリジンからアラニンに置換した発現ベクター (FLAG-HER2-K175A) を準備し、野生型 HA-tagged HER2 (HA-HER2-WT)、SMYD3 発現ベクターとともに、野生型 FLAG-tagged HER2 (FLAG-HER2-WT) ベクターもしくは FLAG-HER2-K175A を 293T 細胞に共発現させた上で、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後にウェスタンブロットを行った (図 16B) ところ、共免疫沈降される置換型 FLAG-HER2 は、野生型 FLAG-HER2 に比べて優位に少なかった。また、同じサンプルに対して抗 FLAG 抗体を使用して免疫沈降を行ったところ、共免疫沈降される野生型 HA-HER2 の量は、置換型 FLAG-HER2 を共発現させたサンプルで優位に少なかった (図 16C)。続いて、SMYD3 による HER2 タンパク質のメ

チル化の生物学的重要性を検討するために、293T 細胞に FLAG-HER2-WT もしくは FLAG-HER2-K175A を Mock もしくは SMYD3 発現ベクターとともに共発現させて、HER2 リン酸化レベルを比較した。図 16D の通り、SMYD3 を過剰発現させたサンプルにおいて HER2 のリン酸化レベルは有意な上昇を認めた。以上より、SMYD3 による HER2 タンパク質のメチル化は、HER2 ホモ 2 量体化を亢進させることで、HER2 のリン酸化レベルに影響することがわかった。

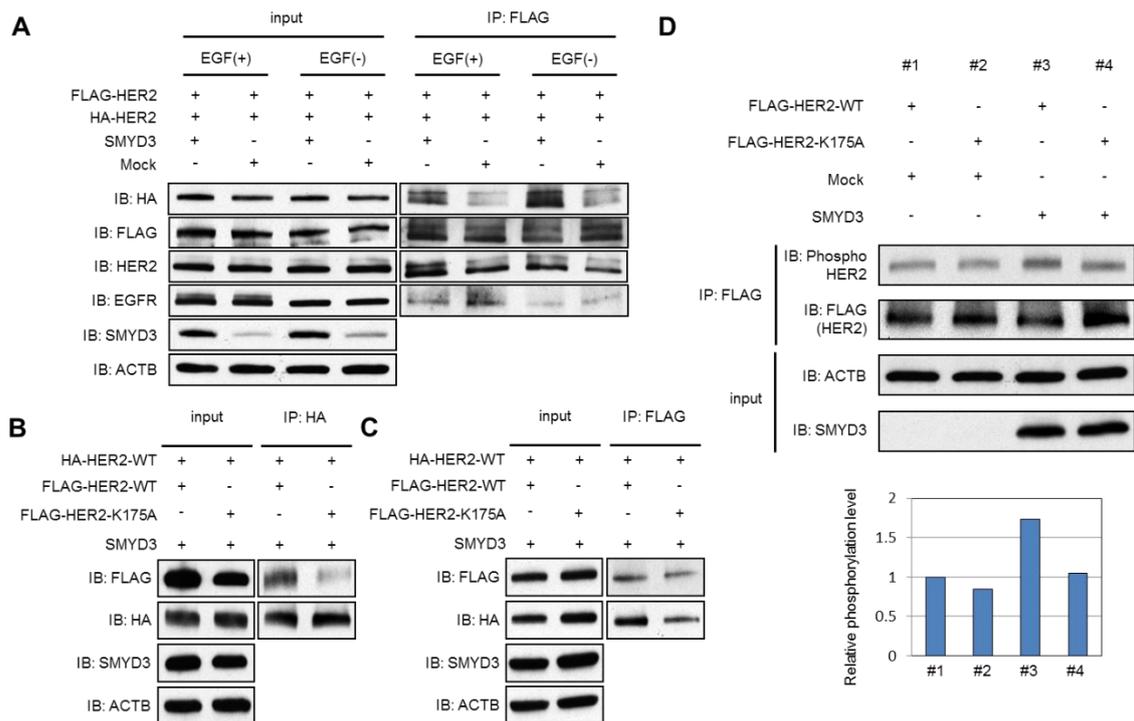


図 16. SMYD3 によるメチル化は HER2 のホモ 2 量体形成を亢進する

A. HeLa 細胞に FLAG-HER2 と HA-HER2 とともに、Mock もしくは SMYD3 発現ベクターを遺伝子導入し 24 時間後に 0 もしくは 100 ng/ μ l の EGF で 5 分間刺激した後に、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したサンプルを用いてウェスタンブロットを行い、共免疫沈降される HA-HER2 レベルを比較した。**B.** **C.** 293 T 細胞に野生型 HA-HER2 と、野生型 FLAG-HER2 もしくは置換型 FLAG-HER2 を SMYD3 発現ベクターと共に共発現させた。48 時間後抽出したタンパク質は、抗 HA 抗体 (**B**) もしくは抗 FLAG 抗体 (**C**) で免疫沈降してウェスタンブロットを行い、共免疫沈降される FLAG-HER2 レベル (**B**) もしくは HA-HER2 (**C**) レベルを比較した。**D.** 293T 細胞に野生型 FLAG-HER2 もしくは置換型 FLAG-HER2 を、Mock もしくは SMYD3 発現ベクターと共に共発現させた後に 48 時間後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったサンプルを用いてウェスタンブロットを行った (上段)。各 X 線フィルムを GS-800™ calibrated densitometer (Bio-Rad) でスキャンしシグナル濃度を数値化し、FLAG レベルで標準化したリン酸化レベルを示した (下段)。

SMYD3 による HER2 メチル化による、HER2 下流シグナル経路への影響

HER2 により活性化される下流のシグナル経路である、PI3K-AKT、RAS-MAPK、PLC γ -PKC といった主要な経路への影響を検討するため Gain-of-functional analysis を行った。ここでは、SMYD3 による他のタンパク質メチル化の影響を排除するために、FLAG-HER2-WT もしくは FLAG-HER2-K175A を HeLa 細胞に過剰発現させて、それぞれの経路のタンパク質 (ERK1/2、AKT、PLC γ 1)リン酸化レベルを調べた。AKT と PLC γ 1 のリン酸化レベルは置換型 HER2 を過剰発現させたサンプルで明らかな低下を認めた。一方で ERK1/2 のリン酸化レベルは差がなかった (図 17A)。なお RAS-MAPK 経路の MAP3K2 は SMYD3 によりメチル化されること、メチル化により SMYD3 が直接的に経路の活性化に働いていることが報告されている[23]。

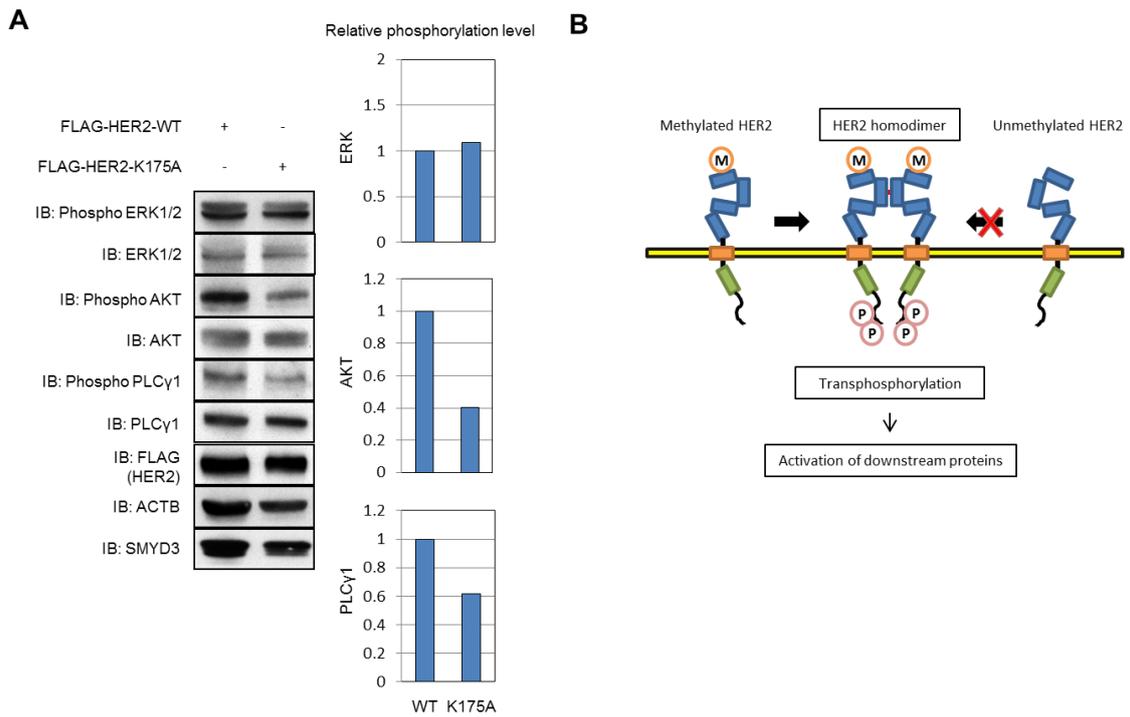


図 17. SMYD3 による HER2 メチル化の下流シグナル経路への影響

A. HeLa 細胞に野生型 HER2 (FLAG-HER2-WT)、もしくは置換型 HER2 (FLAG-HER2-K175A)を遺伝子導入し、48 時間後、タンパク質を抽出しウェスタンブロットにより下流遺伝子 (ERK1/2、AKT、PLC γ 1)のリン酸化レベルを比較した (左)。各 X 線フィルムを GS-800™ calibrated densitometer (Bio-Rad)でスキャンしシグナル濃度を数値化し、各タンパク質のリン酸化レベルを各タンパク質の発現レベルで標準化した (右)。**B.** SMYD3 によるメチル化が HER2 活性化へ及ぼす影響について図式化した。

4. 考察

HER2 は細胞増殖、分化、血管新生やアポトーシスに関連した下流シグナル経路を活性化することで種々のがんにおいて発がんに関与することが知られている[55]。そして、2 量体形成は下流シグナル経路を活性化するための重要な過程であると考えられている。HER2 特異的なリガンドはこれまで発見されておらず、過剰発現のみがホモ 2 量体化を調整する機序であると考えられていた[56]。我々の研究で、SMYD3 によって Lys 175 において HER2 タンパク質がトリメチル化修飾を受けることがわかった (図 14)。乳癌細胞株 ZR75-1 と MCF7 に対して siRNA を用いた Loss-of-functional analysis では、SMYD3 をノックダウンしたサンプルにおいて HER2 の Tyr 1248 におけるリン酸化レベルが低下し、SMYD3 によるメチル化が HER2 の活性化に関与している可能性が示唆された (図 15A)。HER2 のリン酸化部位である Tyr 1248 は細胞内ドメインに存在し、2 量体を形成した際に自己リン酸化が起こり、リン酸化修飾される。今回見つかったメチル化部位である Lys 175 は細胞外ドメインに存在することから、その相関関係を調べるために HER2 タンパク質の構造解析を行った。その結果、ECD I に存在するメチル化部位である Lys 175 の側鎖のアミノ基と、ECD II にある Gly 223 の主鎖のカルボニル基が水素結合していることがわかった (図 15C)。この結果から、

SMYD3によるメチル化が起こることでLys 175の水素結合がメチル基に置き換わり、ECD IとECD IIの空間的位置関係が変化することになる。その結果としてHER2タンパク質の2量体形成のし易さに影響を与えるといった機序が考えられた。この仮説を証明するために、図16Aの実験を行った。ここでSMYD3を共発現させたサンプルでは、共免疫沈降されるHER2の量が増加すること、共免疫沈降されるEGFRの量は変化がないことがわかった。この結果から、SMYD3によるメチル化はHER2ホモ2量体化を促すが、ヘテロ2量体の形成には影響しないと考えられた。さらに、メチル化部位置換体であるHER2-K175Aと、野生型のHER2-WTを用いて2量体形成のしやすさを比較したところ、野生型同士の場合に比較して置換型と野生型の結合が弱いことが判り(図16B)、SMYD3によるLys 175でのメチル化はHER2のホモ2量体形成を増強させることが判明した。次に、Gain-of-functional analysisではSMYD3による他のタンパク質メチル化の影響を排除するために、野生型もしくは置換型のHER2を過剰発現させて下流のタンパク質のリン酸化シグナルを比較した。その結果、AKTとPLC γ 1のリン酸化レベルにおいて、置換体を過剰発現させたサンプルで低下を認めた。以上の結果から、SMYD3によるHER2のメチル化はHER2の2量体化を促し、自己リン酸化を起こすことで下流シグナルを活性化させると考えられた(図17B)。

さらに今回の研究で判明したもう一つの重要な事実は、メチル化部位が細胞外ドメインに存在するということである。これまで細胞外ドメインでメチル化修飾を受けるといった報告は無かった。だが、いくつかのケモカイン受容体では、細胞外ドメインにおいて翻訳後修飾を受けることが知られている。例えば CCR2b、CCR5、CX₃CR1、CXCR4 といった受容体は細胞外ドメインにおいて硫酸化やグリコシル化することが報告されている[57-59]。これらの修飾はリガンドの結合による受容体の活性化に対して補助受容体のように働くと考えられており、今回判明した SMYD3 によるメチル化の機能と近似した部分がある。加えて、最近の生物情報学や細胞内局在解析 (THE HUMAN PROTEIN ATLAS データベースなど)によれば、SMYD3 は核や細胞質だけでなく、ゴルジ体にも存在することが報告されている。以上の事実から、HER2 の細胞外ドメインはゴルジ体でメチル化修飾を受けていると推測されるが、現時点でこれを証明する方法はなく今後も検証が必要である。

今回の実験結果から、SMYD3 による Lys 175 のメチル化は、SMYD3 を過剰発現しているタイプのがん細胞において、HER2 活性化のトリガーになっていると考えられ、メチル基転移酵素 SMYD3 は抗がん治療の標的として良い候補であると考えられた。

第3章

まとめ・今後の展望

これまで、本研究も含め SMYD3 はさまざまながん腫において過剰発現していること[1, 9, 12, 60, 61]、また発がんに関与する機能を有することが報告されてきた[35, 62-64]。しかしながら、非ヒストンタンパク質の SMYD3 によるメチル化に関して、生物学的な重要性はこれまで十分な報告がなかった。最近になって VEGFR1 や MAP3K2 が SMYD3 の基質として報告され、その機能についての検討が行われている[23, 26]。これらの発見は、SMYD3 が既知のシグナル経路に影響を及ぼすユニークなメチル化の機能を有することを示している。本研究では、SMYD3 により AKT1、HER2 といった発がん遺伝子が非ヒストンタンパク質修飾を受けること、がん細胞においてシグナル経路を活性化させること、またその機序を明らかにすることができた。

以上のことから、SMYD3 はがん治療において注目すべき標的分子の1つであると言える。治療標的として考えるうえで、重要な事項は3つあると考えられる。1つは、非ヒストンタンパク質のメチル化修飾の機能解析である。非ヒストンタンパク質メチル化修飾の機能は、酵素と基質の組み合わせで機能が異なる

ことが判っており、まだ明らかとなっていない SMYD3 の基質も存在すると考えられる。今後の更なる SMYD3 によるメチル化の機能解析は、SMYD3 を標的とした治療で起こりうる有害事象も予測できるメリットがあると考えられる。

次に、臨床検体を用いたマーカーとしての有用性の検討が必要である。大腸がん患者の腫瘍サンプルにおける SMYD3 過剰発現の頻度は 50%程度であり、予後との相関が報告されている[65]。この報告からも、腫瘍での高発現を推測できるマーカーの検索はより効率的な患者選択に有益であると考えられる。最後に、SMYD3 によるメチル化を特異的に阻害する化合物の研究開発が重要である。

SMYD3 は非ヒストンタンパク質以外に、ヒストンタンパク質、DNA のメチル化修飾を通して転写の調整を行っている。SMYD3 の酵素活性部位に直接結合しその働きを阻害する化合物の開発が進められているが[35]、こうした化合物はエピジェネティクスに関連した機能まで抑制してしまう可能性がある。今後はメチル化を受ける基質側の構造解析によって、メチル化されるアミノ酸へのメチル基の結合を防ぐ化合物がデザインできれば、がんの活性化に関与する機能を特異的に阻害することができると考えられる。今後も研究を継続し、がん治療を目指していきたい。

謝辞

本論文を終えるにあたり、東京大学大学院医学系研究科 腫瘍外科学/血管外科学の故渡邊聡明教授に謹んで感謝申し上げます。また、御指導を頂いたシカゴ大学 血液・腫瘍内科学 (The University of Chicago, Hematology and Oncology)の中村祐輔教授、浜本隆二先生 (現国立がん研究センター研究所 がん分子修飾制御学分野)に謹んで感謝申し上げます。

引用文献

- [1] R. Hamamoto, V. Saloura, and Y. Nakamura, "Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis," *Nat Rev Cancer*, vol. 15, pp. 110-24, Feb 2015.
- [2] R. P. Ambler and M. W. Rees, "Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein," *Nature*, vol. 184, pp. 56-7, Jul 04 1959.
- [3] A. J. Bannister, R. Schneider, and T. Kouzarides, "Histone methylation: dynamic or static?," *Cell*, vol. 109, pp. 801-6, Jun 28 2002.
- [4] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, and Y. Shi, "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1," *Cell*, vol. 119, pp. 941-53, Dec 29 2004.
- [5] L. Ringrose, H. Ehret, and R. Paro, "Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes," *Mol Cell*, vol. 16, pp. 641-53, Nov 19 2004.
- [6] A. Schlichter and B. R. Cairns, "Histone trimethylation by Set1 is coordinated by the RRM, autoinhibitory, and catalytic domains," *Embo j*, vol. 24, pp. 1222-31, Mar 23 2005.
- [7] M. Tachibana, K. Sugimoto, T. Fukushima, and Y. Shinkai, "Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 25309-17, Jul 06 2001.
- [8] S. Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis, and T. Jenuwein, "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases," *Nature*, vol. 406, pp. 593-9, Aug 10 2000.
- [9] R. Hamamoto, Y. Furukawa, M. Morita, Y. Iimura, F. P. Silva, M. Li, R. Yagy, and Y. Nakamura, "SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells," *Nat Cell Biol*, vol. 6, pp. 731-40, Aug 2004.
- [10] F. T. Steven G. Clarke, "The Enzymes: Protein methyltransferases," *Academic Press*, vol. 24, pp. 3-570, 2006.
- [11] Y. Kotake, R. Cao, P. Viatour, J. Sage, Y. Zhang, and Y. Xiong, "pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene," *Genes Dev*, vol. 21, pp. 49-54, Jan 01 2007.
- [12] R. Hamamoto, F. P. Silva, M. Tsuge, T. Nishidate, T. Katagiri, Y. Nakamura, and Y.

- Furukawa, "Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells," *Cancer Sci*, vol. 97, pp. 113-8, Feb 2006.
- [13] J. Yang, J. Huang, M. Dasgupta, N. Sears, M. Miyagi, B. Wang, M. R. Chance, X. Chen, Y. Du, Y. Wang, L. An, Q. Wang, T. Lu, X. Zhang, Z. Wang, and G. R. Stark, "Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, pp. 21499-504, Dec 14 2010.
- [14] J. Huang, R. Sengupta, A. B. Espejo, M. G. Lee, J. A. Dorsey, M. Richter, S. Opravil, R. Shiekhatar, M. T. Bedford, T. Jenuwein, and S. L. Berger, "p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1," *Nature*, vol. 449, pp. 105-8, Sep 06 2007.
- [15] J. Huang, L. Perez-Burgos, B. J. Placek, R. Sengupta, M. Richter, J. A. Dorsey, S. Kubicek, S. Opravil, T. Jenuwein, and S. L. Berger, "Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation," *Nature*, vol. 444, pp. 629-32, Nov 30 2006.
- [16] S. Chuikov, J. K. Kurash, J. R. Wilson, B. Xiao, N. Justin, G. S. Ivanov, K. McKinney, P. Tempst, C. Prives, S. J. Gamblin, N. A. Barlev, and D. Reinberg, "Regulation of p53 activity through lysine methylation," *Nature*, vol. 432, pp. 353-60, Nov 18 2004.
- [17] T. Lu, M. W. Jackson, B. Wang, M. Yang, M. R. Chance, M. Miyagi, A. V. Gudkov, and G. R. Stark, "Regulation of NF-kappaB by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, pp. 46-51, Jan 05 2010.
- [18] G. R. Stark, Y. Wang, and T. Lu, "Lysine methylation of promoter-bound transcription factors and relevance to cancer," *Cell Res*, vol. 21, pp. 375-80, Mar 2011.
- [19] J. M. Lee, J. S. Lee, H. Kim, K. Kim, H. Park, J. Y. Kim, S. H. Lee, I. S. Kim, J. Kim, M. Lee, C. H. Chung, S. B. Seo, J. B. Yoon, E. Ko, D. Y. Noh, K. I. Kim, K. K. Kim, and S. H. Baek, "EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex," *Mol Cell*, vol. 48, pp. 572-86, Nov 30 2012.
- [20] C. N. Pang, E. Gasteiger, and M. R. Wilkins, "Identification of arginine- and lysine-methylation in the proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its functional implications," *BMC Genomics*, vol. 11, p. 92, Feb 05 2010.
- [21] K. D. Daze and F. Hof, "The cation-pi interaction at protein-protein interaction interfaces: developing and learning from synthetic mimics of proteins that bind methylated lysines," *Acc Chem Res*, vol. 46, pp. 937-45, Apr 16 2013.
- [22] S. Khorasanizadeh, "Recognition of methylated histones: new twists and variations," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 21, pp. 744-9, Dec 2011.
- [23] P. K. Mazur, N. Reynoird, P. Khatri, P. W. Jansen, A. W. Wilkinson, S. Liu, O.

- Barbash, G. S. Van Aller, M. Huddleston, D. Dhanak, P. J. Tummino, R. G. Kruger, B. A. Garcia, A. J. Butte, M. Vermeulen, J. Sage, and O. Gozani, "SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer," *Nature*, vol. 510, pp. 283-7, Jun 12 2014.
- [24] M. Kogure, M. Takawa, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, K. Ueda, R. Ibrahim, T. Tsunoda, M. Sugiyama, Y. Atomi, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination," *Neoplasia*, vol. 15, pp. 1251-61, Nov 2013.
- [25] H. S. Cho, T. Shimazu, G. Toyokawa, Y. Daigo, Y. Maehara, S. Hayami, A. Ito, K. Masuda, N. Ikawa, H. I. Field, E. Tsuchiya, S. Ohnuma, B. A. Ponder, M. Yoshida, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B," *Nat Commun*, vol. 3, p. 1072, 2012.
- [26] M. Kunizaki, R. Hamamoto, F. P. Silva, K. Yamaguchi, T. Nagayasu, M. Shibuya, Y. Nakamura, and Y. Furukawa, "The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3," *Cancer Res*, vol. 67, pp. 10759-65, Nov 15 2007.
- [27] E. E. Vincent, D. J. Elder, E. C. Thomas, L. Phillips, C. Morgan, J. Pawade, M. Sohail, M. T. May, M. R. Hetzel, and J. M. Tavaré, "Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer," *Br J Cancer*, vol. 104, pp. 1755-61, May 24 2011.
- [28] M. Cheung and J. R. Testa, "Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy," *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 13, pp. 234-44, Mar 2013.
- [29] C. H. Chan, U. Jo, A. Kohrman, A. H. Rezaeian, P. C. Chou, C. Logothetis, and H. K. Lin, "Posttranslational regulation of Akt in human cancer," *Cell Biosci*, vol. 4, p. 59, 2014.
- [30] R. Ghosh, A. Narasanna, S. E. Wang, S. Liu, A. Chakrabarty, J. M. Balko, A. M. Gonzalez-Angulo, G. B. Mills, E. Penuel, J. Winslow, J. Sperinde, R. Dua, S. Pidaparathi, A. Mukherjee, K. Leitzel, W. J. Kostler, A. Lipton, M. Bates, and C. L. Arteaga, "Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers," *Cancer Res*, vol. 71, pp. 1871-82, Mar 1 2011.
- [31] T. P. Garrett, N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess, and C. W. Ward, "The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors," *Mol Cell*, vol. 11, pp. 495-505, Feb 2003.
- [32] A. S. Hervent and G. W. De Keulenaer, "Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics," *Int J Mol Sci*, vol. 13, pp.

- 12268-86, Sep 26 2012.
- [33] S. Wakatsuki, F. Saitoh, and T. Araki, "ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation," *Nat Cell Biol*, vol. 13, pp. 1415-23, Nov 06 2011.
- [34] M. A. Ashwell, J. M. Lapierre, C. Brassard, K. Bresciano, C. Bull, S. Cornell-Kennon, S. Eathiraj, D. S. France, T. Hall, J. Hill, E. Kelleher, S. Khanapurkar, D. Kizer, S. Koerner, J. Link, Y. Liu, S. Makhija, M. Moussa, N. Namdev, K. Nguyen, R. Nicewonger, R. Palma, J. Szwaya, M. Tandon, U. Uppalapati, D. Vensel, L. P. Volak, E. Volckova, N. Westlund, H. Wu, R. Y. Yang, and T. C. Chan, "Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors," *J Med Chem*, vol. 55, pp. 5291-310, Jun 14 2012.
- [35] A. Peserico, A. Germani, P. Sanese, A. J. Barbosa, V. di Virgilio, R. Fittipaldi, E. Fabini, C. Bertucci, G. Varchi, M. P. Moyer, G. Caretti, A. del Rio, and C. Simone, "A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth," *J Cell Physiol*, vol. 230, pp. 2447-60, Oct 2015.
- [36] L. Piao, D. Kang, T. Suzuki, A. Masuda, N. Dohmae, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "The histone methyltransferase SMYD2 methylates PARP1 and promotes poly(ADP-ribosyl)ation activity in cancer cells," *Neoplasia*, vol. 16, pp. 257-64, 264.e2, Mar 2014.
- [37] H. S. Cho, G. Toyokawa, Y. Daigo, S. Hayami, K. Masuda, N. Ikawa, Y. Yamane, K. Maejima, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, B. A. Ponder, Y. Maehara, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "The JmjC domain-containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene," *Int J Cancer*, vol. 131, pp. E179-89, Aug 01 2012.
- [38] G. Toyokawa, H. S. Cho, K. Masuda, Y. Yamane, M. Yoshimatsu, S. Hayami, M. Takawa, Y. Iwai, Y. Daigo, E. Tsuchiya, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, Y. Maehara, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Histone lysine methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in human carcinogenesis through regulation of the Wnt pathway," *Neoplasia*, vol. 13, pp. 887-98, Oct 2011.
- [39] S. Hayami, M. Yoshimatsu, A. Veerakumarasivam, M. Unoki, Y. Iwai, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, H. Yamaue, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Overexpression of the JmjC histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway," *Mol Cancer*, vol. 9, p. 59, Mar 13 2010.

- [40] S. Hayami, J. D. Kelly, H. S. Cho, M. Yoshimatsu, M. Unoki, T. Tsunoda, H. I. Field, D. E. Neal, H. Yamaue, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers," *Int J Cancer*, vol. 128, pp. 574-86, Feb 01 2011.
- [41] C. C. Thomas, M. Deak, D. R. Alessi, and D. M. van Aalten, "High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate," *Curr Biol*, vol. 12, pp. 1256-62, Jul 23 2002.
- [42] C. C. Milburn, M. Deak, S. M. Kelly, N. C. Price, D. R. Alessi, and D. M. Van Aalten, "Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change," *Biochem J*, vol. 375, pp. 531-8, Nov 01 2003.
- [43] C. S. Gradziel, Y. Wang, B. Stec, A. G. Redfield, and M. F. Roberts, "Cytotoxic amphiphiles and phosphoinositides bind to two discrete sites on the Akt1 PH domain," *Biochemistry*, vol. 53, pp. 462-72, Jan 28 2014.
- [44] J. D. Carpten, A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, and J. E. Thomas, "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer," *Nature*, vol. 448, pp. 439-44, Jul 26 2007.
- [45] N. Gally, C. Dos Santos, L. Cuzin, M. Bousquet, V. Simmonet Gouy, C. Chaussade, M. Attal, B. Payrastre, C. Demur, and C. Recher, "The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia," *Leukemia*, vol. 23, pp. 1029-38, Jun 2009.
- [46] F. Eisenhaber. (2006). *Discovery Biomolecular Mechanisms with Computational Biology*.
- [47] J. C. Rice, K. Nishioka, K. Sarma, R. Steward, D. Reinberg, and C. D. Allis, "Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes," *Genes Dev*, vol. 16, pp. 2225-30, Sep 01 2002.
- [48] W. J. van Blitterswijk and M. Verheij, "Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1831, pp. 663-74, Mar 2013.
- [49] J. J. Gills and P. A. Dennis, "Perifosine: update on a novel Akt inhibitor," *Curr Oncol Rep*, vol. 11, pp. 102-10, Mar 2009.

- [50] K. Sone, L. Piao, M. Nakakido, K. Ueda, T. Jenuwein, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production and DNA repair," *Nat Commun*, vol. 5, p. 5691, 2014.
- [51] S. Hu, Y. Sun, Y. Meng, X. Wang, W. Yang, W. Fu, H. Guo, W. Qian, S. Hou, B. Li, Z. Rao, Z. Lou, and Y. Guo, "Molecular architecture of the ErbB2 extracellular domain homodimer," *Oncotarget*, vol. 6, pp. 1695-706, Jan 30 2015.
- [52] X. Deng, G. Von Keudell, T. Suzuki, N. Dohmae, M. Nakakido, L. Piao, Y. Yoshioka, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "PRMT1 promotes mitosis of cancer cells through arginine methylation of INCENP," *Oncotarget*, vol. 6, pp. 35173-82, Nov 3 2015.
- [53] M. Yoshimatsu, G. Toyokawa, S. Hayami, M. Unoki, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, Y. Maehara, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, "Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers," *Int J Cancer*, vol. 128, pp. 562-73, Feb 1 2011.
- [54] V. G. Anania, V. C. Pham, X. Huang, A. Masselot, J. R. Lill, and D. S. Kirkpatrick, "Peptide level immunoaffinity enrichment enhances ubiquitination site identification on individual proteins," *Mol Cell Proteomics*, vol. 13, pp. 145-56, Jan 2014.
- [55] J. Baselga and S. M. Swain, "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, pp. 463-75, Jul 2009.
- [56] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, "Untangling the ErbB signalling network," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 2, pp. 127-37, Feb 2001.
- [57] A. A. Preobrazhensky, S. Dragan, T. Kawano, M. A. Gavrillin, I. V. Gulina, L. Chakravarty, and P. E. Kolattukudy, "Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region," *J Immunol*, vol. 165, pp. 5295-303, Nov 01 2000.
- [58] J. Gutierrez, L. Kremer, A. Zaballos, I. Goya, A. C. Martinez, and G. Marquez, "Analysis of post-translational CCR8 modifications and their influence on receptor activity," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 14726-33, Apr 09 2004.
- [59] M. Farzan, T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, and H. Choe, "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry," *Cell*, vol. 96, pp. 667-76, Mar 05 1999.
- [60] M. Tsuge, R. Hamamoto, F. P. Silva, Y. Ohnishi, K. Chayama, N. Kamatani, Y. Furukawa, and Y. Nakamura, "A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers," *Nat Genet*, vol. 37, pp. 1104-7, Oct 2005.
- [61] F. P. Silva, R. Hamamoto, M. Kunizaki, M. Tsuge, Y. Nakamura, and Y. Furukawa,

- "Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells," *Oncogene*, vol. 27, pp. 2686-92, Apr 24 2008.
- [62] B. Shen, M. Tan, X. Mu, Y. Qin, F. Zhang, Y. Liu, and Y. Fan, "Upregulated SMYD3 promotes bladder cancer progression by targeting BCLAF1 and activating autophagy," *Tumour Biol*, vol. 37, pp. 7371-81, Jun 2016.
- [63] M. E. Sarris, P. Moulos, A. Haroniti, A. Giakountis, and I. Talianidis, "Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development," *Cancer Cell*, vol. 29, pp. 354-66, Mar 14 2016.
- [64] Y. Liu, X. Luo, J. Deng, Y. Pan, L. Zhang, and H. Liang, "SMYD3 overexpression was a risk factor in the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma," *Tumour Biol*, vol. 36, pp. 2685-94, Apr 2015.
- [65] S. S. Naiqing Liu, Xiaoqing Yang, "Prognostic significance of stromal SMYD3 expression in colorectal cancer of TNM stage I-III," *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 10, pp. 8901-8907, 2017.