

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 吉岡 佑一郎

要旨

タンパク質の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。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、さらに酵素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。非ヒストンタンパク質のメチル化修飾に関しては、機能に関しては以下の5つが報告されている。①他のタンパク質修飾への影響。②タンパク質間相互作用への影響。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。これらの機能は酵素と基質の組み合わせで異なり、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、メチル化修飾を受ける残基、その個々の機能などに関しては現時点でほとんどが解明されていない。

メチル基転移酵素の一つである SMYD3 は 2004 年に浜本らにより遺伝子が同定され、SMYD3 が大腸がんや肝細胞がんにおいて過剰発現しており、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 といった非ヒストンタンパク質が SMYD3 にメチル化されることが報告されている。

本研究は、網羅的に行った *in vitro* methyltransferase assay により 2 つのがん関連遺伝子 AKT1 と HER2 が SMYD3 によりメチル化されることを同定したことを受け、第 1 章で AKT1、第 2 章で HER2 のメチル化に関して機能解析を行い、がん細胞における SMYD3 の重要性を検討した。

AKT1 は乳がん、大腸がん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。AKT1 の翻訳後修飾に関してはリン酸化やユビキチン化修飾に関する報告はあるが、メチル化修飾に関する報告はなかった。

SMYD3 によるメチル化を確認するために SMYD3 の濃度を変えた *in vitro* methyltransferase assay を行ったところ、AKT1 のメチル化シグナルは SMYD3 用量依存的に増強した。次に LC-MS/MS 解析によってメチル化部位として PH ドメイン上に存在する Lys 14、30、39 を同定した。また Lys 14 に関しては異なる種間でも広く保存されており機能的重要性が示唆された。PH ドメインは細胞膜に存在するリン脂質との結合において重要であり、また AKT1 タンパク質は

膜上に局在して活性化することから、AKT1 のメチル化とリン酸化の関係性に注目した。メチル化部位を置換した AKT1 ベクターを用意し、野生型 AKT1 ベクターとともに 293T 細胞に遺伝子導入してウェスタンブロット (WB) を行ったところ、Lys 14 を置換した AKT1 において Thr 308 におけるリン酸化レベルは著明な低下を認めた。また、Lys 39 の置換によってもリン酸化レベルは低下したが、Lys 30 の置換では全く変化が見られなかった。AKT1 タンパク質の X 線結晶構造解析によると、Lys 14 と Glu 17 は水素結合をしており、かつ 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。Lys 14 のメチル化は、水素結合を疎水性のメチル基に置換するため、Lys 14 と Glu17 間の静電相互作用を減弱化させる。結果的に Glu 17 に関連した構造の自由度が増すことで間接的に 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。

AKT1 における Lys 14 のモノメチル化に対する特異抗体を作成し、ELISA 試験等でその抗体の高い特異性を確認した。続いて、野生型 AKT1、もしくは Lys 14 を置換した置換型 AKT1 ベクターと、SMYD3 発現ベクターもしくは酵素活性を死活化させた SMYD3 発現ベクターを 293T 細胞に遺伝子導入し WB を行った。SMYD3 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、SMYD3 によるメチル化を介したリン酸化への影響が示唆された。

大腸がん細胞株 SW480、乳がん細胞株 MDA-MB-231 に対して siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンさせると、AKT1 のメチル化、リン酸化レベルと同様に mTOR のリン酸化レベルに有意な低下を認めた。また SMYD3 阻害剤である BCI-121 を同細胞株に投与すると、容量依存的に AKT1 のメチル化、リン酸化レベルが低下した。次に、293T 細胞と HeLa 細胞に野生型 AKT1 と共に Mock もしくは SMYD3 発現ベクターと共発現させたところ、SMYD3 過剰発現細胞において、AKT1 のメチル化、リン酸化レベル、mTOR のリン酸化レベルの増強を認めた。

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。この報告と、先に示した構造解析により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 細胞に野生型もしくは置換型 AKT1 ベクターを SMYD3 発現ベクターと共発現させて、免疫細胞染色と WB で細胞内のタンパク質の局在を調べたところ、置換型 AKT1 は野生型 AKT1 のような細胞膜への強い局在を認めなかった。最後に、恒常的に野生型 AKT1 もしくは置換型 AKT1 を過剰発現する形質転換細胞 SW480 を用意した。野生型 AKT1 発現細胞において細胞増殖アッセイでは優位に高い増殖能を示し、細胞周期解析では S 期にある細胞数の増加、WB では高い AKT1 リン酸化レベルを示した。以上より、SMYD3 による Lys14 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た。

HER2 も AKT1 と同様、主要ながん遺伝子の一つであり、種々の悪性腫瘍において過剰発現が報告されている。HER2 タンパク質のリン酸化が下流シグナル経路の活性化に重要であることは知られているが、メチル化に関しての報告はなかった。

SMYD3によるメチル化を確認するために、SMYD3の濃度を変えた *in vitro* methyltransferase assay を行ったところ HER2 のメチル化シグナルは SMYD3 用量依存的に増強した。次に LC-MS/MS 解析を行い、HER2 が Lys 175 においてメチル化されることを同定した。

乳がん細胞株 (ZR75-1 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ではリン酸化レベルの低下を認めた。HER2 の細胞外ドメイン (ECD) は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 と呼ばれているが、ECD II は HER2 タンパク質の2量体形成における接合部である。タンパク質立体構造解析によると ECD II にある Gly 223 が ECD I に存在する Lys 175 と水素結合しており、Lys 175 へのメチル基の結合が水素結合を阻害し、ECD I と ECD II の空間的位置関係を変化させることで2量体化のし易さに影響を与えうるものと考えられた。

HeLa 細胞に FLAG-HER2 ベクターと、HA-HER2 ベクターを mock もしくは SMYD3 発現ベクターと共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。WB では SMYD3 を過剰発現させた細胞において、共免疫沈降された HA-HER2 が著明に増加していた。次に野生型 HA-HER2 ベクター、SMYD3 発現ベクターとともに、野生型もしくは置換型 FLAG-HER2 ベクターを 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。続いて、293T 細胞に野生型もしくは置換型 HER2 ベクターを Mock もしくは SMYD3 発現ベクターと共発現させて、HER2 リン酸化レベルを比較したところ、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。

最後に HER2 により活性化される下流のシグナル経路への影響を検討するため、野生型もしくは置換型 HER2 を HeLa 細胞に過剰発現させて、主要な下流タンパク質 (ERK1/2、AKT、PLC γ 1) のリン酸化レベルを比較したところ、AKT と PLC γ 1 のリン酸化レベルは置換型 HER2 発現細胞において低下を認めた。以上の結果より、SMYD3 による HER2 の Lys 175 におけるメチル化は、HER2 ホモ2量体形成を促し、HER2 とその下流遺伝子のリン酸化レベルに影響することが判明した。

本研究では、SMYD3 により AKT1、HER2 といったがん関連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。以上より、SMYD3 はがん治療において標的分子となり得ると考えられた。