

審査の結果の要旨

氏名 吉岡 佑一郎

メチル基転移酵素 SMYD3 はさまざまな悪性腫瘍において発がんに関与すると考えられているが、その機序は明確になっていない。本研究では SMYD3 が非ヒストンタンパク質である AKT1、HER2 タンパク質をメチル化修飾することが明らかとなり、さらにそれぞれの基質に対してメチル化修飾が及ぼす機能の解析を試みたものであり、以下の結果が得られている。

1. AKT1 タンパク質と SMYD3、メチル基供与体である S-adenosyl-L-methionine (SAM)を用いた *in vitro* methyltransferase assay の結果、SMYD3 によって AKT1 がメチル化されることが示された。さらに、AKT1 タンパク質と SMYD3 を *in vitro* methyltransferase assay によってメチル化反応させた試料を用いて LC-MS/MS 解析を行った結果、SMYD3 は *in vitro* で AKT1 の Lys 14、Lys 30、Lys 39 をモノメチル化することが示された。
2. AKT1 の Lys 14、Lys 30、Lys 39 それぞれの Lys を Ala に置換した変異型 AKT のなかで、Lys 14 を置換した変異体をもっとも AKT1 の Thr 308 のリン酸化レベルが低下していることが示された。AKT1 タンパク質の立体構造解析の結果、Lys 14 と Glu 17 は水素結合をしており、かつ Glu 17 は Thr 308 の存在する活性化ループと Van der Waals 接触をしている可能性が示唆された。以上より、Lys 14 のメチル化が、AKT1 の立体構造の変化により Thr 308 のリン酸化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。
3. 大腸がん細胞株 SW480 と乳がん細胞株 MDA-MB-231 において、siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンさせたところ、コントロールと比較して AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベルが低下すること、さらに下流のタンパク質である mTOR のリン酸化レベルが低下することが示された。同様に、SMYD3 酵素活性阻害剤である BCI-121 で同細胞株を処理したところ、BCI-121 用量依存的に AKT1 のメチル化レベル、リン酸化レベルが低下することが示された。また一方で、SMYD3 を過剰発現させた細胞株 (HeLa、293 T)では、AKT1 のメチル化、リン酸化レベルが共に上昇すること、mTOR のリン酸化レベルも上昇することが示された。これらの結果から SMYD3 による AKT1 の Lys 14 でのメチル化が、AKT1 のリン酸化、さらには下流タンパク質の活性化に影響することが示された。
4. HeLa 細胞に野生型の AKT1 もしくは、Lys 14 を Ala に置換した置換型 AKT1 を遺伝子導入し、免疫細胞染色で細胞内局在を比較したところ、野生型 AKT1 は主に細胞

膜に局在したが、置換型 AKT1 は主に細胞質に存在し、野生型 AKT1 のような細胞膜への強い集積は認めなかった。この結果から、AKT1 の Lys 14 におけるメチル化が、AKT1 タンパク質の局在にも影響していることが示された。

5. 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 を作製し、細胞増殖能、細胞周期を比較した。野生型 AKT1 を過剰発現する細胞では置換型に比較して有意に高い増殖能を示し、細胞周期では S 期にある細胞数の明らかな増加を示した。
6. HER2 タンパク質と SMYD3、SAM を用いた *in vitro* methyltransferase assay によって、SMYD3 によって HER2 がメチル化されることが示された。さらに HER2 タンパク質と SMYD3 を *in vitro* methyltransferase assay によってメチル化反応させた試料を用いた LC-MS/MS 解析の結果、SMYD3 は HER2 を Lys 175 においてトリメチル化することが判明した。
7. 乳がん細胞株 ZR75-1 と MCF7 において、siRNA を用いて SMYD3 をノックダウンさせたところ、コントロールと比較して HER2 のリン酸化レベルが低下することが示された。HER2 タンパク質立体構造解析では、ECD I に存在する Lys 175 が、ECD II に存在する Gly 223 と水素結合している可能性が示唆された。以上より、Lys 175 でのメチル化は ECD II との立体的位置関係を変化させることで 2 量体形成を促し、細胞内ドメインでのリン酸化レベルに影響を及ぼす可能性が示された。
8. 2 種類の異なるタグの付いた HER2 発現プラスミド (HA-HER2 と FLAG-HER2) と、SMYD3 もしくは Mock を共発現させて抗 FLAG 抗体で免疫沈降させたところ、SMYD3 を共発現させたサンプルで共免疫沈降される HA-HER2 が著明に増加した。SMYD3 によるメチル化が HER2 ホモ 2 量体形成を促す可能性が示された。
9. 代表的な HER2 の下流シグナルである PI3K-AKT、RAS-MAPK、PLC γ -PKC への影響を調べるため、野生型 HER2 もしくは Lys 175 を Ala に置換した置換型 HER2 を過剰発現させて、AKT、ERK1/2、PLC γ 1 のリン酸化レベルを比較したところ、置換型を過剰発現させた細胞で AKT、PLC γ 1 のリン酸化レベルが低下していることが示された。

以上、本論文は SMYD3 により AKT1、HER2 タンパク質がメチル化修飾を受けること、またそれらのメチル化が、AKT1、HER2 それぞれのリン酸化を促し、リン酸化シグナル経路を刺激していることを示した。以上の結果は、SMYD3 のがん治療の標的候補としての可能性を示す知見であり、学位の授与に値するものと考えられる。