

# (國崎 真己) 論文内容の要旨

## 主 論 文

The lysine 831 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1,  
a Novel Target of Methylation by SMYD3

VEGFR 1 の 831 番目のリジンは SMYD3 の新たなメチル化の標的である。

國崎 真己、浜本 隆二、Fabio Pittella、山口貴世志  
永安 武、澁谷正文、古川洋一、中村裕輔

Cancer Research 67 巻 22 号 10759-10765 November 15 2007

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：永安 武 教授)

緒 言 近年ヒストン蛋白の様々な修飾が転写制御等様々な機能に関わることが注目されており、リン酸化、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、スモ化等多くの蛋白の修飾が全世界的に研究されている。その中で我々は SMYD3 がヒストン H3 の 4 番目のリジンをメチル化する methyltransferase であることを同定した。またマイクロアレーのデータ解析から SMYD3 が大腸癌や乳癌、膵癌、肝癌等多くの癌種において発現上昇しており、かつそれらの癌種の細胞増殖に深く関わることを突き止めた。しかしこれまでに多くの研究がなされてきているにも関わらず methyltransferase の細胞増殖に関与するメカニズムはいまだ不透明な部分が多く存在する。近年ヒストン蛋白のメチル化に加え、p53 等のノンヒストン蛋白の報告がなされてきており、また我々の行った whole cell lysate を用いた SMYD3 のメチル化反応の結果、ヒストン以外に多くの蛋白のメチル化のバンドを確認できたことから、SMYD3 の関与する細胞増殖のメカニズムとして我々はヒストン蛋白のメチル化だけではなく、ノンヒストン蛋白のメチル化も関与するのではないかと考え、SMYD3 の新たなメチル化修飾の target を検索することとした。

対象と方法 蛋白のメチル化はいまだ新しい概念であり、リン酸化のように様々な手法が存在すれば網羅的な解析が可能であったが実験を始めた段階で困難であったため、細胞増殖に深く関わると思われる癌遺伝子、癌抑制遺伝子及び腫瘍血管増殖関連遺伝子を中心としてピックアップした多くの遺伝子をクローニングし、蛋白精製を行い、トリチウムを用いて各々のメチル化の活性を測定した。Positive control としてヒストン蛋白を Negative control としては MAPK を用いて行い、いくつかの有望な candidate を同定し、引き続きその機能解析を行った。その候補遺伝子

の一つとして VEGFR1 を同定した。そこでさらに詳しいメチル化部位の同定のため、SMYD3 の局在が細胞質であることから、VEGFR1 の細胞内ドメインを様々な長さでクローニングし、その蛋白を用いて我々が構築したトリチウム BAS システムを用いて、Western blot の手法でメチル化のバンドを確認した。また同時にシーケンス解析を併用して詳細なメチル化部位を同定した。また実際に *in vivo* においてもそのような現象が確認できるかを特異的なメチル化抗体を作成して行った。次に実際そのメチル化がどのように細胞増殖に関与するかを調べるため VEGFR1 のリン酸化に関する影響についても解析を行った。

**結 果** トリチウム BAS 及びシーケンス解析の結果から VEGFR1 の kinase ドメインに存在する 831 番目のリジンがメチル化されることを同定した。またその配列はこれまでに報告されているメチル化部位の解析から導き出された consensus motif と一致するものであり、この配列は様々な種においても保存されていた。またこの 831 番目のリジン特異的なメチル化抗体を作成し、この抗体を用いて VEGFR1 を transfection した SMYD3 の stable 細胞株を用いた実験においても同様にメチル化のバンドが確認された。そこでさらに細胞増殖に関与するメカニズムの一つとしてこれまでに報告されている VEGFR1 のリン酸化に対する影響を調べるため、VEGFR1 及びメチル化された VEGFR1 を器質として用いたリン酸化のアッセイを行い、その結果リン酸化がメチル化修飾されることにより増強することを同定した。そこでさらにその現象が *in vivo* においても確認されるかを調べるため、HEK293 の SMYD3 の stable transformat 及び mock 株に VEGFR1 を強制発現させた系を用いて、VEGFR1 のリガンド刺激によるリン酸化の違いを IP 産物を用いて比較検討したところ、SMYD3 の stable 株においてリン酸化が亢進していることが確認された。以上の結果から SMYD3 は VEGFR1 の細胞内ドメインの N 末にある 831 番目のリジンをメチル化し、それに伴って VEGFR1 のリン酸化を増強することを突き止めた。

**考 察** 我々は大腸癌や乳癌等多くの癌種で発現上昇している SMYD3 が、近年腫瘍血管内皮細胞のみならず癌細胞での発現も報告されてきている VEGFR1 の K831 をメチル化し、さらにそのリン酸化を増強することを突き止めた。これらの結果は SMYD3 及び VEGFR1 のみならず、ヒストン及びノンヒストン蛋白のメチル化の関与する分子生物学的役割を解析する上で非常に有用な発見であると思われる。またこれまでの分子標的治療薬は主に抗体を用いてリガンドを trap することやリン酸化を直接制御することによりその効果発現を期待されてきたが、今回の結果は、蛋白のメチル化を制御することにより細胞増殖及び腫瘍血管新生や転移を抑制する可能性を示唆するものであり、メチル化阻害による新たな抗癌剤の開発に大きく貢献できるのではないかと考えられる。