

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06693

研究課題名(和文)メチル基転移酵素の多重特異性創出機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of multi-specific substrate recognition by the methyltransferase

研究代表者

中木戸 誠(Nakakido, Makoto)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：80784511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素の持つ多重特異性の分子機構についてアミノ酸残基レベルで知見を得ることを目的とし、多様な蛋白質の翻訳後修飾を担うメチル基転移酵素SMYD2を題材に研究を行った。SMYD2および基質タンパク質であるp53について、野生型および基質結合に関与していると考えられるSMYD2のアミノ酸残基に変異を導入した変異体を作製し、物理化学的手法によって相互作用解析を行うことにより、各アミノ酸残基の基質結合への寄与について定量的な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal the molecular mechanism how a multi-specific enzyme recognizes its substrate. We selected SMYD2, a methyltransferase which has methylation activity to a variety of substrates including histone and non-histone proteins, as a model protein. We prepared SMYD2, its substrate p53, and several SMYD2 mutants with mutations on amino acid residues that are supposed to be involved in substrate recognition as recombinant protein and conducted the analysis of the interaction between SMYD2 wild-type/mutants and p53. Though the analyses, we quantitatively described the contribution of each amino acid residue on substrate recognition.

研究分野：生物分子化学

キーワード：分子認識 多重特異性 メチル基転移酵素 相互作用 物理化学

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の翻訳後修飾を担う酵素は基質蛋白質を特異的に認識し、種々の修飾基を付与する。蛋白質は翻訳後修飾によってその活性を制御されるため、修飾酵素による精確な基質認識は極めて重要なプロセスである。多くの場合、酵素は特定の基質蛋白質を特異的に認識・結合し、修飾反応を触媒するが、複数の基質に対する特異性を有し修飾反応を促進する酵素が存在する。それぞれの基質蛋白質の機能が修飾によって制御されており、その制御の異常がしばしば疾患へとつながるため、これらの多重特異性を持つ酵素がいかにして多様な基質蛋白質を認識し、それぞれの修飾反応を触媒するかを分子レベルで理解することは疾患の理解およびその治療戦略を立てる上で極めて重要である。

蛋白質のメチル化は非常に重要な翻訳後修飾の一つである。メチル基を付与することによって蛋白質間相互作用に影響を与える、他の翻訳後修飾を阻害あるいは促進する、標的蛋白質の細胞内局在を変化させるといった分子機構によって細胞内の蛋白質機能を制御している。加えてヒストン蛋白質のメチル化を通じた転写活性の制御にも関与しており、その制御システムの破綻はしばしばがんをはじめとする疾患へとつながる。メチル基転移酵素 SMYD2 はがんで高発現しており、そのメチル化活性を通じてヒト細胞のがん化に寄与すると考えられている。SMYD2 は 2006 年にヒストンメチル基転移酵素として同定され、ヒストン H3 を基質として持つことが報告されたが、その後多くの研究グループによって種々の非ヒストン蛋白質が基質として同定されてきており、それら基質のメチル化のがん化への寄与が近年注目を集めている。個々の基質のメチル化修飾がそれぞれ固有の機能を有しているため、特定の基質の認識・メチル化を阻害することは疾患の副作用の小さい治療戦略へとつながる可能性

がある。そのためには SMYD2 がどのようにして多様な基質を特異的に認識しているかの精査が重要な鍵となる。近年、次々に SMYD2 の新規基質が同定されてきているとともに、結晶構造解析などの生化学的手法によって SMYD2 の基質認識に関する研究が報告され始めているが、SMYD2 の多重特異性の創出機構については未だ不明瞭な点が多く、体系的な解析が急務である。

2. 研究の目的

酵素の持つ多重特異性の分子機構に関するアミノ酸残基レベルでの知見を得るため、多様な蛋白質の翻訳後修飾を担うメチル基転移酵素に着目した。メチル基転移酵素 SMYD2 はヒストン H3 へのメチル基の付与を担う酵素として同定されたが、その後、種々の非ヒストン蛋白質を基質として認識し、メチル化反応を触媒することが明らかとされてきている。そこで本研究では、SMYD2 と非ヒストン基質を標的とし、酵素-基質間相互作用について物理化学的手法を用いて精査することにより、酵素が多様な基質を特異的に認識する分子機構をアミノ酸残基レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

SMYD2 による基質認識の分子機構を明らかにするため、大腸菌発現系を用いて SMYD2 および基質である p53 を組換え蛋白質として調製し、物理化学的手法により相互作用解析を行った。また、既報の SMYD2/p53 ペプチド複合体の結晶構造を基に、基質ペプチドとの結合に関与していると考えられる SMYD2 のアミノ酸残基に変異を導入した SMYD2 についても組換え蛋白質を調製し、物性を評価するとともに p53 組換え蛋白質との相互作用解析を行い、基質との界面に存在していると考えられる SMYD2 アミノ酸残基の基質認識への寄与について定量的な記述を試みた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌発現系による SMYD2 および p53 の調製・物性解析

大腸菌発現系によって SMYD2 および基質である p53 を全長タンパク質として発現・精製を行った。SMYD2 に関して、可溶化タグとの融合タンパク質として発現させた。内部に亜鉛結合モチーフであるジンクフィンガーを有することから、培養液中への亜鉛添加の影響について解析を行ったところ、培養液中への亜鉛添加によって発現量が有意に増加した。このことより、亜鉛結合による SMYD2 の安定化が示唆された。また、p53 についても可溶化タグと融合させる形で発現させ、各種クロマトグラフィーによって精製を行い、SMYD2 および p53 の双方とも全長タンパク質として相互作用解析に十分な純度の組換え蛋白質を得ることに成功した。得られた SMYD2 組換え蛋白質について、円偏光二色性による二次構造解析により、適切なフォールディングを組んだ組換えタンパク質が得られたことを確認した。また、メチル基供与体である SAM の存在下/非存在下において SMYD2 の熱安定性を分析したところ、SAM の存在下において変性温度が上昇し、SAM との結合による SMYD2 酵素の安定化が示唆された。

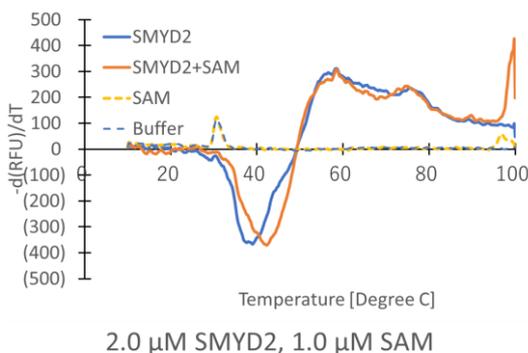


図 1: SAM の存在下/非存在下における SMYD2 の熱安定性解析

(2) SMYD2-p53 間相互作用の物理化学的解析

SMYD2-p53 間相互作用について、速度論的な観点から定量解析を行うため、バイオレイ

ヤー干渉 (BLI) 法を用いた相互作用解析を行った。メチル基供与体である SAM および SAM からメチル基が脱離した SAH の存在下/非存在下において相互作用解析を行ったところ、SAM/SAH の存在によって p53 の結合レスポンスが有意に上昇した。このことより、メチル基供与体の結合が SMYD2 による基質認識に重要な役割を果たしていることが示唆された (図 2)。

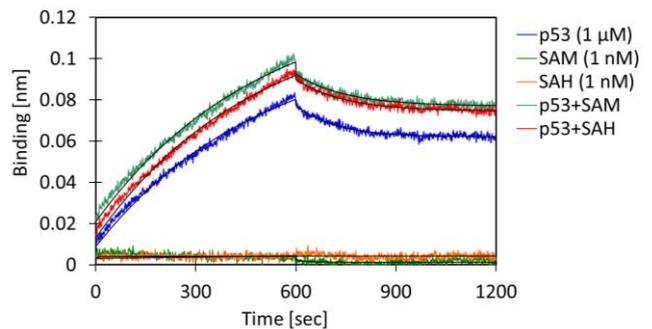


図 2: BLI 法による SMYD2-p53 間相互作用の解析.

(3) SMYD2 変異体の調製・物性解析

SMYD2/p53 ペプチド複合体の結晶構造を基に、基質ペプチドとの相互作用に寄与していると考えられる SMYD2 の基質ポケット内のアミノ酸残基を変異させた変異体を設計した。この際、SMYD2 の別の基質である ER α ペプチドとの複合体結晶構造との比較により、p53 ペプチドとの相互作用のみに寄与していると考えられるアミノ酸残基を 4 つ選び出し、それぞれについて野生型と同様にして大腸菌発現系によって発現・精製を行った。これら 4 種の変異体のうち、3 種については野生型と同等の収量にて組換えタンパク質が得られたが、1 種の変異体について、精製段階において分解され、十分な収量のタンパク質を得ることができなかった。このことより、基質ポケット内のアミノ酸残基の SMYD2 タンパク質の構造安定性への寄与が示唆された。また、得られたタンパク質について円偏光二色性によって二次構造を解析したところ、上

記、分解が誘導された変異体について、野生型とは異なる CD スペクトルが得られた。このことから、このアミノ酸変異が SMYD2 の二次構造変化を引き起こし、結果全体構造の不安定化につながったと考えられる。

(4) SMYD2 変異体-p53 間相互作用解析

得られた SMYD2 変異体を用いて、野生型同様、BLI 法によって p53 との相互作用解析を行った。3 種の変異体のうち、2 種については 3 倍程度の親和性低下が見られた。残り 1 種については他 2 種より大きく、7 倍程度の親和性低下が見られ、基質認識に重要な役割を果たす残基であることが示唆された。また、いずれの変異体についても野生型に比して親和性が低下していることから、全長基質の場合でも基質ペプチドと同様のアミノ酸残基を介して結合していることが示された。今後、結晶構造中で ER α ペプチドとの相互作用に寄与していると考えられるアミノ酸残基を変異させた変異体を調製して相互作用解析を行うとともに、ER α についても組換えタンパク質を調製して相互作用解析を行うことにより、引き続き基質間での認識の違いに関する分子機構を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件) (全て査読あり)

Tashima T, Nakakido M (4 番目), 他 9 人, Molecular basis for governing the morphology of type I collagen fibrils by Osteomodulin. *Commun. Biol.*, in press 2018.

Miyabe K, Nakakido M (4 番目), 他 7 人, Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody. *J Biochem.*, in press 2018.

Tanabe A, Nakakido M (3 番目), 他 7 人, Production and characterization of a novel site-specific-modifiable anti-OX40-receptor single-chain variable fragment for targeted drug delivery.

Biochem Biophys Res Commun., 2018, 5:496(2):614-620. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.051.

Yui A, Nakakido M (4 番目), 他 5 人, Thermodynamic analyses of amino acid residues at the interface of an antibody B2212A and its antigen roundabout homolog 1." *J Biochem.*, 2017, 162(4):255-58. DOI: 10.1093/jb/mvx050.

Hoshino M, Nakakido M (2 番目), 他 6 人, Biophysical characterization of the interaction between heme and proteins responsible for heme transfer in *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2017, 493(2):1109-1114, DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.055.

Piao L, Nakakido M (3 番目), 他 2 人, Regulation of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 functions by post-translational modifications. *Frontiers in Biosci., Landmark*, 2017, 23, 13-26

Yoshioka Y, Nakakido M (4 番目), 他 8 人, SMYD3-mediated lysine methylation in the PH domain is critical for activation of AKT1., *Oncotarget.*, 2016, 7(46):75023-75037, DOI: 10.18632/oncotarget.11898

[学会発表] (計 17 件)

[国際学会]

Emina Ikeuchi, Makoto Nakakido (3 番目), 他 5 人, Analysis of the denaturant in midpoint to design the VHH with high thermal stability, 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society, 2018 年

Kouhei Yoshida, Makoto Nakakido (4 番目), 他 8 人, Physicochemical analysis of antigen-antibody interaction associated with charge exchange of amino acids, The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC 2017), 2017 年

[国内学会]

KAWADE Raiji, Nakakido Makoto (3 番目), 他 7 人, Structural, physicochemical and computational analysis to reveal the mechanism of recognition of phosphorylated antigen by an antibody, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年

河上 恵理, 中木戸 誠 (3 番目), 他 2 人, 分子シミュレーションと物理化学解析による抗体の熱安定性に関する研究, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年

石井 美咲、中木戸 誠 (2 番目)、他 1 人、フ
ァージディスプレイによるメチル化リジン
特異的抗体の取得、2017 年度生命科学系学会
合同年次大会、2017 年

青木 将洋、中木戸 誠 (2 番目)、他 1 人、基
質選択的な阻害を目指したメチル基転移酵
素 SMYD2 の多重特異的基質認識機構の解明、
2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017
年

森 千夏、中木戸 誠 (2 番目)、他 2 人、イ
ンターロイキン 11 シグナルを制御するシン
グルドメイン抗体の探索、2017 年度生命科学
系学会合同年次大会、2017 年

吉田 浩平、中木戸 誠 (3 番目)、他 7 人、ア
ミノ酸電荷交換に関する抗原-抗体相互作用
の物理化学解析、第 11 回 バイオ関連化学
シンポジウム、2017 年

宮鍋 一紘、中木戸 誠 (4 番目)、他 6 人、
抗ペプチド抗体による硫酸化 CCR5 ペプチド
認識機構の熱力学的解析、第 17 回 日本蛋
白質学会年会、2017 年

田島 卓実、中木戸 誠 (4 番目)、他 6 人、
Weak electrostatic interaction of an
extracellular matrix protein plays a key
role in a shapecontrol of collagen
assembly、第 17 回 日本蛋白質学会年会、
2017 年

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP (成果リストを記載)

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中木戸 誠 (Nakakido Makoto)

東京大学・大学院工学系研究科 (工学部)・
助教

研究者番号 : 80784511