

論文内容の要旨

論文題目:

HTLV-1 Tax とヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 の相互作用の
解析

(Interaction of HTLV-1 Tax with an H3K4 histone methyltransferase
SMYD3)

氏名: 山本 啓裕

[背景]

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍化は典型的な多段階発癌モデルに合致する事が示されているが、その分子機構の詳細は不明である。

ATL の発症には HTLV-1 の制御タンパク質 Tax が重要な役割を果たしていると考えられている。Tax は主に核内に局在するリン酸化タンパク質であり、宿主細胞のタンパク質とタンパク質間相互作用を介してウイルス遺伝子の転写活性化のみならず、宿主細胞のシグナル伝達系、遺伝子発現、細胞周期制御等を脱制御し、感染 T 細胞の不死化および腫瘍化に関与していると考えられている。

一方、宿主細胞の遺伝子発現制御において、ヒストン化学修飾=ヒストンコードの役割が注目されている。ヒストン化学修飾にはアセチル化、メチル化、リン酸化等があるが、これらの化学修飾がクロマチン構造制御を介して遺伝子発現を制御すると考えられている。

Tax はヒストン化学修飾分子と会合する事で遺伝子発現の脱制御に関与する事が明らかになり、これまでにヒストンアセチル化酵素活性を持つコアクチベーター-CBP/p300 やヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 と会合することにより、ヒストン化学修飾を介した遺伝子発現の活性化、抑制化に関与する事が報告されてきた。

ヒストンメチル化酵素と Tax との相互作用に関しては当研究室により、ヒストン H3K9 のメチル化に関与する SUV39H1 をとりあげ解析を行い、Tax が SUV39H1 の SET ドメインを含む領域で会合する事、SUV39H1 のメチル化活性依存的に Tax の転写活性化能を抑制する事等を明らかにして報告した。また、SET ドメインはヒストンメチル化酵素が共通して保持する領域である事から、Tax がヒストンメチル化酵素ファミリーと広く相互作用する可能性が示唆された。

多くのヒストンメチル化酵素がヒストン H3K9 を標的として遺伝子発現の抑制をもたらす一方、ヒストン H3K4 のメチル化は遺伝子発現の活性化に重要な役割を果たしており、そのメカニズムも徐々に明らかにされつつある。近年新たに報告された SMYD3 はヒストン H3K4 を標的としたメチル化酵素で遺伝子発現の誘導をもたらす事、大腸癌、肝癌等の腫瘍細胞等で高発現している事が報告された。HTLV-1 感染による Tax 標的遺伝子の過剰発現および Tax による腫瘍化機構の解明を目指すうえで、遺伝子発現制御に関与する分子、特に転写活性化に関与するヒストンメチル化酵素と Tax との相互作用の検討とその生物学的意義を明らかにする事は興味ある検討課題であると考えた。

[目的]

本研究は未だ明らかにされていない転写活性化に関与するヒストンメチル化酵素と Tax との相互作用を検討する事を目的とし、その代表例として SMYD3 をとりあげ Tax との相互作用を検討する事とした。

[方法]

1. Tax と SMYD3 の会合の有無の検討：*in vivo* の解析は HEK293T 細胞に SMYD3 および Tax を一過性に過剰発現させ、それぞれの特異抗体を用いて免疫共沈法により検討した。*in vitro* における解析は大腸菌を用いて発現誘導し、精製した GST および GST-SMYD3 および His-Tax もしくは *in vitro* translation/transcription 法により合成した Tax を用いて、GST-Pull-down 法により行った。また、会合領域を検討するために両タンパク質の欠損変異体を作製し GST-Pull-down 法により解析を行った。
2. Tax および SMYD3 共存下における細胞内局在変化の観察：Tax および SMYD3 が示す細胞内局在を検討するため、Tax および SMYD3 を一過性過剰発現させた HeLa 細胞株を Alexa Fluor 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。また、Tax、SMYD3 共存下での細胞内局在の変化が細胞周期依存的であるかを検討するため、Tax および SMYD3 を一過性過剰発現させた HeLa 細胞株もしくは Tax を一過性過剰発現させた SMYD3 安定発現 HeLa 細胞株 (HA-SMYD3-HeLa) を、細胞周期を調整した後、免疫染色し共焦点顕微鏡で観察した。
3. SMYD3 が Tax 活性化能へ与える影響：Tax は NF- κ B シグナル伝達系およびウイルスのプロモーターである LTR プロモーター活性の活性化に影響を与える事が報告されている。SMYD3 が Tax の転写制御機能に与える影響を検討するために、Tax 標的である NF- κ B のプロモーターで制御されるレポータープラスミド (p6kB-Luc) および HTLV-1 LTR プロモーターで制御されるプラスミド (pHTLV-LTR-Luc) を用いたレポータージーンアッセイを行った。
4. HTLV-1 感染 T 細胞における Tax-SMYD3 の相互作用の検討：T 細胞における SMYD3 のタンパク質レベルでの発現の有無を確認後、過剰発現系の実験で観察された結果が感染 T 細胞で観察されるかを検討した。

[結果]

1. 免疫共沈法と GST-Pull-down 法の結果から Tax と SMYD3 が *in vivo* で会合する、直接会合する事が明らかになった。また、Tax および SMYD3 の会合領域を検討した結果、Tax は SMYD3 の SET ドメインを含まない C 末領域で会合する事が明らかになった。
2. 細胞内局在を観察したところ、Tax 単独では主に核内で観察され、SMYD3 単独では核内で局在する場合と細胞質で局在する場合が観察された。Tax および SMYD3 共存下で細胞内局在を観察

したところ、SMYD3 が核内に局在する時は Tax の局在が核内で観察され、SMYD3 が細胞質に局在する時は Tax の局在が細胞質で観察された。核移行シグナル欠損型 Tax (Tax-DN108) および核移行シグナル失活型 Tax (Tax-C29A) を用いて観察したところ、Tax 変異体単独では細胞質での局在が観察されたが、SMYD3 および Tax 変異体共存下では、SMYD3 が核内に局在する時は Tax 変異体の局在が核内で観察された。Tax 結合能欠損型 SMYD3 (SMYD3-DNHSCF、SMYD3-B) を用いて観察したところ、SMYD3 変異体単独では細胞質に局在し、SMYD3 変異体および Tax 共存下では SMYD3 変異体は細胞質に、Tax は核で局在が観察された。次に、SMYD3 の細胞内局在は細胞周期依存的であることから、Tax、SMYD3 共存下での細胞内局在の変化が細胞周期依存的であるかを検討した。SMYD3 単独では G1 期において細胞質で局在が観察され、cell cycle の進行とともに核内への移行が観察された。Tax 単独では主に核内で、Tax 変異体単独では細胞質での局在が観察されたが、細胞周期依存的な細胞内局在の変化は見られなかった。Tax および SMYD3 共存下での細胞周期依存的細胞内局在の変化を観察したところ、Tax は G1 期において細胞質で局在が観察され、cell cycle の進行と共に核内への移行が観察された。また Tax 変異体と SMYD3 を用いて同様の実験を行ったところ、Tax 変異体は G1 期において細胞質で局在が観察され、cell cycle の進行と共に核内への移行が観察された。これらの結果から SMYD3 は細胞周期依存的に Tax の細胞内局在を支配している可能性が示唆された。

3. NF- κ B シグナル伝達系に関して、Tax-SMYD3 共発現において、SMYD3 が量依存的に Tax による 6kB プロモーターの転写活性化能を増強する事が明らかになった。また、この増強は G1 期において顕著にみられた。HTLV-1 LTR プロモーター活性に関して、Tax-SMYD3 共発現下では G1 期において、SMYD3 は Tax による LTR プロモーター活性の活性化能を抑制する事が明らかになった。Tax との結合能を有するが核移行能を有さない SMYD3 (SMYD3-TaxBD) を用いて同様の実験を行ったところ、NF- κ B シグナル伝達系および HTLV-1 LTR プロモーター活性共に野生型 Tax を用いた際と同様の結果が得られた。
4. HTLV-1 感染細胞株において SMYD3 の発現が確認され、同時に過剰発現条件下で観られたものと同様の相互作用が観察された。

[考察]

本研究では未だ会合が明らかにされていない転写の活性化に関与するヒストンメチル化酵素と Tax との相互作用を初めて明らかにした。今回の結果から Tax-SMYD3 相互作用が HTLV-1 感染 T 細胞に与える機能的影響として以下のようなモデルを考えている。HTLV-1 感染後、感染細胞から Tax が発現する。Tax は細胞内の SMYD3 と結合し、Tax-SMYD3 複合体は SMYD3 の局在変化に依存して、細胞周期依存的に細胞内局在を変化する。その際、G1 期で細胞質内において NF- κ B シグナル伝達系を活性化し、S 期、G2/M 期で核において LTR プロモーターを活性化する。Cell cycle の進行でこの機構が繰り返され、結果的に HTLV-1 感染 T 細胞が不死化へ導かれる、というモデルである。以上の結果から、Tax と SMYD3 との相互作用が細胞周期依存的な細胞内局在の変化を通じて、Tax の機能を制御する可能性を示唆されたと考えている。