

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07650

研究課題名(和文) タンパク質恒常性の破綻による大腸がん増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of NRF3-mediated protein degradation in colorectal cancer development

研究代表者

和久 剛 (Waku, Tsuyoshi)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：40613584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NRF3は翻訳制御因子であるCPEB3を直接転写する。CPEB3はNRF3ホモログであるNRF1の3' UTRに結合しNRF1の翻訳を抑制する。それによりタンパク質分解複合体であるプロテアソームの発現や活性が低下し、がん患者の予後不良につながる可能性を見出した。またNRF3はタンパク質分解以外にも、主要な脂質代謝の1経路であるコレステロール生合成をリプログラムし、細胞内の中性脂肪量を減少させることを見出した。さらにNRF3はマクロピノサイトーシスと呼ばれる基質非特異的なエンドサイトーシスを誘導することで、細胞内のコレステロール量を一定に保っていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が解明したNRF3-CPEB3-NRF1経路を標的とすることで、がん細胞に特異的に作用するタンパク質分解のコントロールを目的とした新たな抗がん剤開発につながることを期待できる。また本研究ではNRF3がコレステロール生合成を調節することで中性脂肪量を減少させることも見出した。以上の知見は、NRF3が肥満とがん悪性化をつなぐキーファクターである可能性を強く示している。肥満はがん増悪の原因となることが知られているが不明な点も多いことから、本研究で得られた知見は肥満とがんの関連を理解する上で重要なものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of how proteasome activity is maintained in cancer cells has remained unclear. The transcription factor NRF1 induces the expression of almost all proteasome-related genes under proteasome inhibition. NRF1 and its phylogenetically closest homolog NRF3 are both highly expressed in several types of cancers, such as colorectal cancer. Herein, we provide the novel regulatory mechanism of basal proteasome activity in cancer cells through an NRF3-CPEB3-NRF1 translational repression axis.

The genetic association of a transcription factor NRF3 with obesity has been suggested, although the molecular mechanisms remain unknown. Here, we found that NRF3 up-regulated gene expression in the SREBP2-dependent mevalonate pathway by inducing the gene expression and forming a transcriptional complex. NRF3 also induced macropinocytosis for cholesterol uptake and GGPP production for lipogenesis inhibition. This study provides the gene expression network of NRF3-regulated lipid metabolism.

研究分野：遺伝子発現

キーワード：遺伝子発現 腫瘍 タンパク質分解 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、細胞内で不要あるいは過剰になったタンパク質を分解することで生体の恒常性を維持し、その破綻は様々な疾患を引き起こす。転写因子 NRF1 が、26S プロテアソームによるユビキチン依存的なタンパク質分解を制御し、その破綻が神経変性疾患を引き起こすことを報告している。興味深いことに、プロテアソーム阻害剤は抗がん剤として臨床使用されていることから、タンパク質恒常性の破綻とがん増悪の関連が示唆されている。しかしながら、がん細胞におけるプロテアソーム活性の制御や、その破綻によるがん増悪化の分子基盤は不明であった。

代表者は NRF1 のホモログである NRF3 が腫瘍部位に高発現していることに着目し、ヒトがん培養細胞を用いて解析を行った。その結果、NRF3 は分子シャペロンの POMP を転写し、ユビキチン非依存的なプロテアソーム(20S プロテアソーム)を活性化することを見出した。さらにマウス移植実験から、NRF3-POMP-20S 活性化経路の亢進は腫瘍増大に寄与することを明らかにした。さらに代表者は、NRF3 によるもう一つのプロテアソーム制御経路として、RNA 結合タンパク質である CPEB3 の発現を介した NRF1 翻訳阻害の可能性を見出しつつある。NRF1 は 26S 活性を維持することから、NRF3 は POMP-20S 活性化経路を介してユビキチン非依存的なタンパク質分解を亢進する一方で、CPEB3-26S 抑制を介してユビキチン依存的なタンパク質分解を低下することで、がん増悪に寄与していると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質恒常性の破綻によるがん増悪メカニズムを解明することであり、その端緒として NRF3-CPEB3-26S 抑制経路の分子生物学的な検証を試みた。また NRF3-CPEB3-26S 抑制経路の検証が想定よりも順調に進展したため、2 年次後半からは新たに見出した NRF3 による脂質代謝リプログラム機構の解明に取り掛かった。

## 3. 研究の方法

### (1) NRF3-CPEB3-26S 抑制経路の分子生物学的検証と臨床的知見

代表者の先行研究から、NRF3 は CPEB3 発現を介して NRF1 の翻訳を抑制していることに加え、NRF1 遺伝子の 3' 末端にある非翻訳領域 (3' UTR) が NRF3 による翻訳抑制に重要であることも見出している。すなわち、NRF3 によって発現した CPEB3 は、NRF1-3' UTR に結合することで、その翻訳を抑制していると考えられる。本課題では NRF3-CPEB3-26S 抑制経路を検証するため、ヒトがん培養細胞を用いて翻訳解析を行った。樹立済みの NRF3 過剰発現細胞に CPEB3 siRNA を導入し、NRF1 タンパク質量が回復するかをウエスタンブロットで確認した。次に、CPEB3 が NRF1 mRNA に結合しているかを RNA 免疫クロマチン沈降実験により確認した。またルシフェラーゼレポーターを応用した翻訳解析を用いて、NRF3 による NRF1 翻訳抑制には必要なゲノム領域を同定した。次に NRF3-CPEB3 経路がプロテアソーム活性に及ぼす影響を調べるため、NRF3 過剰発現細胞の CPEB3 をノックダウンして、プロテアソームの蛍光基質を用いて活性測定した。またプロテアソーム活性が細胞増殖に及ぼす影響も WST-1 試薬を用いて調べた。加えて、NRF3-CPEB3 経路の異常活性化が癌増悪に及ぼす影響を調べるため、がん患者の遺伝子発現と予後を含む公共データベースを用いた生存曲線解析を行なった。

### (2) NRF3 による脂質代謝リプログラム機構の解明

タンパク質分解以外の NRF3 下流経路を、取得済みの NRF3 過剰発現細胞及び NRF3 発現低下細胞の DNA マイクロアレイデータを用いた網羅的な遺伝子発現解析により探索し、リアルタイム PCR によって評価した。それによって、コレステロール生合成に関わるメバロン酸経路を活性化する可能性を見出した。次にコレステロール生合成の主要な制御転写因子である SREBP2 に着目し、NRF3 が SREBP2 活性に及ぼす影響をウエスタンブロット、及びルシフェラーゼレポーター測定で調べた。またガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) によって、コレステロールとその前駆体であるラノステロールを測定した。また細胞内の中性脂肪量を NileRed 染色で定量し、NRF3 が脂肪蓄積に及ぼす影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) NRF3-CPEB3-26S 抑制経路の分子生物学的な検証をおこなった結果、NRF3 が直接転写した CPEB3 が NRF1-3' UTR に結合し、NRF1 mRNA 上のポリソーム形成を減少させることで NRF1 の翻訳を抑制することも明らかにした。また NRF3 過剰発現細胞に CPEB3 をノックダウンすると、プロテアソーム関連遺伝子の発現や活性、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブへの抵抗性が有意に上昇することを見出した。加えて臨床分析から、大腸癌患者の予後が CPEB3/NRF3 mRNA 高発群で低下することも見出した。これらの結果は、NRF3-CPEB3-NRF1 翻訳抑制軸は、癌細胞の生存・増殖だけでなく、癌患者の予後にも関わる新たなプロテアソーム活性調節メカニズムであることを示している。以上の知見は、下記の学術論文として掲載された。

Waku, T., Katayama, H., Hiraoka, M., Hatanaka, A., Nakamura, N., Tanaka, Y., Tamura, N., Watanabe, A., Kobayashi, A. (2020). NFE2L1 and NFE2L3 Complementarily Maintain Basal Proteasome Activity in Cancer Cells through CPEB3-Mediated Translational Repression. *Mol. Cell. Biol.* 40, e00010-20.

(2) 本研究の主目的であった NRF3-CPEB3-26S 抑制経路について論文報告できたことから、新たに見出した NRF3 と脂質代謝との関連について解析を進めた。コレステロールは細胞膜の構成成分であるだけでなく、その中間代謝産物であるファルネシルニリン酸 (FPP) やゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) は、低分子量 G タンパク質のプレニル化に利用され、様々なタンパク質の活性を制御するなど重要な役割を担っている。網羅的な遺伝子発現解析とリアルタイム PCR による NRF3 下流経路の探索から、NRF3 がコレステロール生合成経路を制御する可能性を見出した。さらにコレステロール代謝の主要転写因子 SREBP2 に着目した生化学的な解析から、NRF3 は SREBP2 を活性化することに加え、SREBP2 と転写複合体を形成することで、コレステロール生合成の律速酵素である HMGCR を含む一部の合成酵素を選択的に転写していることを明らかにした。そこで、NRF3 がコレステロール生合成経路をリプログラムしているかガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を行った。その結果、NRF3 過剰発現によってコレステロール量は変化しなかった一方で、コレステロール前駆体であるラノステロール量が有意に減少していた。そこで次に細胞内コレステロール量が変化しない点に着目し、そのメカニズムの解明を行った。その結果、NRF3 はマクロピノサイトーシスと呼ばれる基質非特異的なエンドサイトーシスを誘導することで細胞外からコレステロールを取り込むことで、細胞内のコレステロール量を一定に保っていることを明らかにした。また、NiIeRed 染色によって、NRF3 は細胞内の中性脂肪量を減少させることを見出した。中性脂肪は肥満の原因であることから、NRF3 を介した脂質代謝リプログラム機構は抗肥満作用を有している可能性が示された。下記の学術論文として掲載された。

Waku, T., Hagiwara, T., Tamura, N., Atsumi, Y., Urano, Y., Suzuki, M., Iwami, T., Sato, K., Yamamoto, M., Noguchi, N., Kobayashi, A. (2021). NRF3 upregulates gene expression in SREBP2-dependent mevalonate pathway with cholesterol uptake and lipogenesis inhibition. *iScience* 24, 103180.

また本研究期間内に発表したこれら NRF3 によるタンパク質及び脂質恒常性メカニズムに関する 2 報の学術論文の知見に基づき、下記の英文総説 1 報を上梓した。

Waku, T., and Kobayashi, A. (2021). Pathophysiological Potentials of NRF3-Regulated Transcriptional Axes in Protein and Lipid Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 22.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Waku Tsuyoshi, Kobayashi Akira	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathophysiological Potentials of NRF3-Regulated Transcriptional Axes in Protein and Lipid Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12686 ~ 12686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Waku Tsuyoshi, Hagiwara Toru, Tamura Natsuko, Atsumi Yuri, Urano Yasuomi, Suzuki Mikiko, Iwami Takuya, Sato Katsuya, Yamamoto Masayuki, Noguchi Noriko, Kobayashi Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 NRF3 upregulates gene expression in SREBP2-dependent mevalonate pathway with cholesterol uptake and lipogenesis inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103180 ~ 103180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Waku Tsuyoshi, Katayama Hiroyuki, Hiraoka Miyako, Hatanaka Atsushi, Nakamura Nanami, Tanaka Yuya, Tamura Natsuko, Watanabe Akira, Kobayashi Akira	4. 巻 40
2. 論文標題 NFE2L1 and NFE2L3 Complementarily Maintain Basal Proteasome Activity in Cancer Cells through CPEB3-Mediated Translational Repression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00010-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00010-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aono Shiori, Hatanaka Ayari, Hatanaka Atsushi, Gao Yue, Hippo Yoshitaka, Taketo Makoto Mark, Waku Tsuyoshi, Kobayashi Akira	4. 巻 20
2. 論文標題 -Catenin/TCF4 Complex-Mediated Induction of the NRF3 (NFE2L3) Gene in Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3344 ~ 3344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Akira, Waku Tsuyoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 New addiction to the NRF2 related factor NRF3 in cancer cells: Ubiquitin independent proteolysis through the 20S proteasome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 6~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omi Jumpei, Watanabe-Takahashi Miho, Igai Katsura, Shimizu Eiko, Tseng Ching-Yi, Miyasaka Tomohiro, Waku Tsuyoshi, Hama Shinichiro, Nakanishi Rieka, Goto Yuki, Nishino Yuri, Miyazawa Atsuo, Natori Yasuhiro, Yamashita Makoto, Nishikawa Kiyotaka	4. 巻 11
2. 論文標題 The inducible amphisome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13974-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Waku Tsuyoshi, Nakamura Nanami, Koji Misaki, Watanabe Hidenori, Katoh Hiroki, Tatsumi Chika, Tamura Natsuko, Hatanaka Atsushi, Hirose Shuuhei, Katayama Hiroyuki, Tani Misato, Kubo Yuki, Hamazaki Jun, Hamakubo Takao, Watanabe Akira, Murata Shigeo, Kobayashi Akira	4. 巻 40
2. 論文標題 NRF3-POMP-20S Proteasome Assembly Axis Promotes Cancer Development via Ubiquitin-Independent Proteolysis of p53 and Retinoblastoma Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00597-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00597-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 和久剛, 小林聡
2. 発表標題 NRF1 and NRF3 complementarily maintain basal proteasome activity in cancer cells through CPEB3-Mediated translational repression
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和久剛、廣瀬修平、谷美里、佐藤清敏、大澤毅、曾我朋義、小林聡
2. 発表標題 転写因子NRF3はがん細胞内のセリン代謝を制御する
3. 学会等名 先端モデル動物プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuyoshi Waku
2. 発表標題 Colorectal cancer addicts ubiquitin-independent 20S proteasomes assembled by the NRF3-POMP axis
3. 学会等名 2019 Meeting on Ubiquitin, Autophagy & Disease (Cold Spring Harbor Laboratory Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 がん増悪性転写因子NRF3 (NFE2L3) は mTORC1シグナルを活性化するアミノ酸センサーである
2. 発表標題 和久剛
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和久剛
2. 発表標題 NRF3-POMP経路を介したユビキチン非依存的なタンパク質分解の誘導による がん増悪メカニズム
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Waku
2. 発表標題 NRF3 (NFE2L3) contributes to colorectal cancer development through 20S proteasome assembly and the ubiquitin-independent proteolysis
3. 学会等名 The Environmental Response V /17th JBS Biofrontier Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Waku
2. 発表標題 NRF3 acts as a tumorigenic transcription factor for the assembly of a ubiquitin-independent 20S proteasome
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和久剛
2. 発表標題 NRF3-POMP経路を介したユビキチン非依存的なタンパク質分解の誘導によるがん増悪メカニズム
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 聡  (Kobayashi Akira)  (50292214)	同志社大学・生命医科学部・教授    (34310)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------