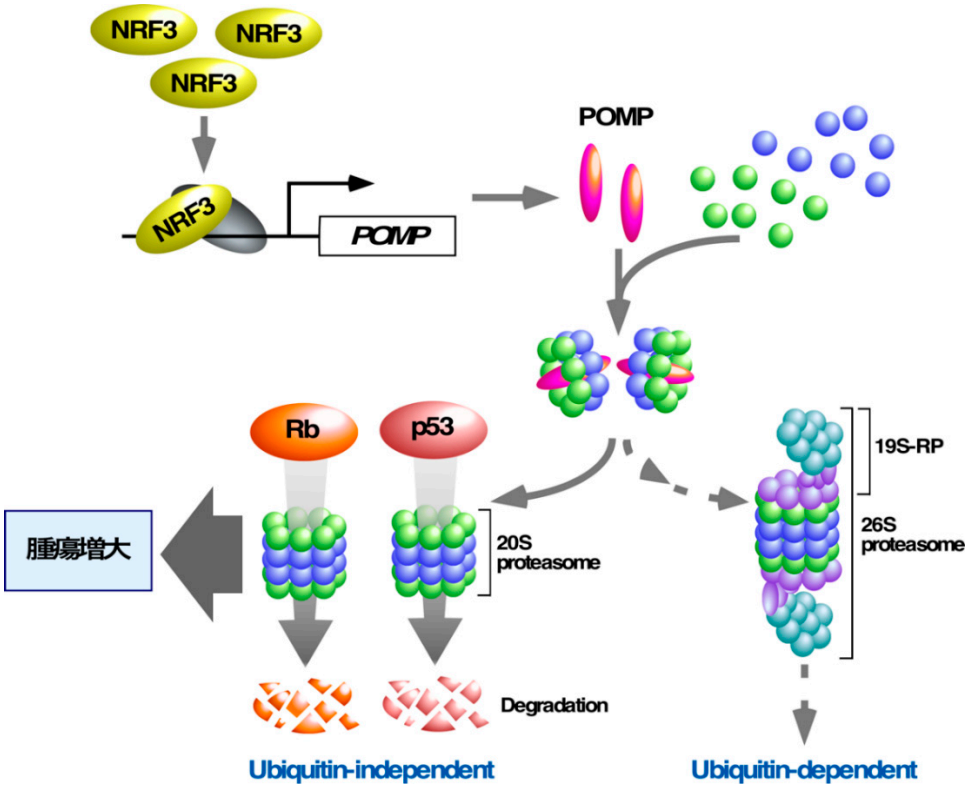
186　腫瘍増大に寄与する20Sプロテアソーム制御機構の解明	和久　剛

【目的】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しているため、その機能低下は神経変性疾患など様々な疾患の要因になる。その一方で、がん組織ではプロテアソーム活性の亢進が見られるため、プロテアソーム阻害剤が抗がん剤として臨床使用されている。このことは、本来は生体の恒常性維持に寄与しているプロテアソームが、がん細胞の生存や増殖にも必要であることを示唆している。しかしながら、がん細胞におけるプロテアソーム活性亢進メカニズムは不明であった。我々はこれまでに、転写因子 NRF3（NFE2L3）を過剰発現するヒト肺がん細胞 H1299 を樹立しマウス移植した結果、コントロールとして用いた GFP 過剰発現細胞に比べ、NRF3 発現により腫瘍が増大することを明らかにしていた。また、NRF3 過剰発現細胞ではユビキチン認識ユニットをもたないプロテアソーム（20S プロテアソーム）の会合が促進している可能性を見出していた。そこで本研究では、NRF3 による 20S プロテアソーム会合促進機構の解明とがん増悪との関連について調べた。

【方法】樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール細胞を用いて、1. リアルタイム qPCR 解析、2. クロマチン免疫沈降（ChIP）-qPCR 解析、3. CRISPR/Cas9 を用いた *POMP*-ARE 変異細胞株の樹立、4. 20S プロテアソーム活性測定、5. マウス移植解析、6. ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いた発現解析を行った。

【結果】樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール細胞を用いて、遺伝子発現解析の結果、NRF3 は 20S プロテアソーム会合因子である POMP を直接転写することを明らかにした。また CRISPR/Cas9 解析によって、この NRF3-POMP 経路が 20S プロテアソーム活性促進だけでなく腫瘍増大にも寄与していることも実証した。さらにユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いたウエスタンブロット解析の結果、がん抑制因子である p53 と Retinoblastoma (Rb) タンパク質がユビキチン非依存的に分解されることを見出した。

NRF3-POMP-20S プロテアソーム会合促進による腫瘍増大メカニズム



186. 腫瘍増大に寄与する 20S プロテアソーム制御機構の解明

和久　剛

同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科 遺伝情報研究室

Key words：がん，20S プロテアソーム，ユビキチン非依存的タンパク質分解，NRF3（NFE2L3）

緒　言

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しているため、その機能低下は神経変性疾患など様々な疾患の要因になる。その一方で、がん組織ではプロテアソーム活性の亢進が見られるため、プロテアソーム阻害剤が抗がん剤として臨床使用されている。このことは、本来は生体の恒常性維持に寄与しているプロテアソームが、がん細胞の生存や増殖にも必要であることを示唆している。しかしながら、がん細胞におけるプロテアソーム活性亢進メカニズムは不明であった。我々はこれまでに、転写因子 NRF3（NFE2L3）を過剰発現するヒト肺がん細胞 H1299 を樹立しマウス移植した結果、コントロールとして用いた GFP 過剰発現細胞に比べ、NRF3 発現により腫瘍が増大することを明らかにしていた。また、NRF3 過剰発現細胞ではユビキチン認識ユニットをもたないプロテアソーム（20S プロテアソーム）の会合が促進している可能性を見出していた。そこで本研究では、NRF3 による 20S プロテアソーム会合促進機構の解明とがん増悪との関連について調べた。

方　法

1.　リアルタイム qPCR 解析

樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール GFP 過剰発現の各 H1299 細胞から ISOGENⅡを用いてトータル RNA を精製した。各トータル RNA から M-MLV RTase を用いて cDNA 合成した後、各プロテアソームサブユニット遺伝子プライマーと SYBR Premix Ex TaqⅡによってリアルタイム qPCR を行った。

2. クロマチン免疫沈降（ChIP）-qPCR 解析

NRF3 過剰発現細胞およびコントロール GFP 過剰発現細をホルマリン固定後に溶解し、抗 NRF3 抗体を結合させたビーズを加え免疫沈降を行う。抗体ビーズを洗浄、脱クロスリンク、タンパク質除去し、NRF3 が結合したゲノム DNA を抽出する。その後、各ゲノム領域プライマーと SYBR Premix Ex TaqⅡによってリアルタイム qPCR を行った。

3. CRISPR/Cas9 を用いた *POMP*-ARE 変異細胞株の樹立

POMP プロモーター内の NRF3 応答配列（*POMP*-ARE）を標的とした guide DNA を、Cas9 発現プラスミド pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 に組み込んだ。次に、*POMP*-ARE-Cas9 発現プラスミドを NFE3 過剰発現 H1299 細胞に導入し、ゲノム DNA シークエンスによって *POMP*-ARE が変異しているクローン細胞株を単離した。

4. 20S プロテアソーム活性測定

コントロール GFP 過剰発現、NRF3 過剰発現、*POMP*-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各細胞を 10%～40%グリセロール密度勾配超遠心にて分画した後、各画分の蛍光プロテアソーム基質 Suc-LLVY の分解強度を測定した。

5. マウス移植解析

コントロール GFP 過剰発現細、NRF3 過剰発現細胞、*POMP*-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各 H1299 細胞を、BALB/cAJcl-nu/nu マウス（4 週齢雌）の腹側皮下に移植した。28 日飼育した後、摘出腫瘍の重量を測定した。

6. ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いた発現解析

樹立済みだった NRF3 過剰発現およびコントロール GFP 過剰発現の各 HCT116 細胞を 10 μM TAK-243 もしくは DMSO（コントロール）含有培地で培養した。24 時間後、p53 と Rb タンパク質をウエスタンブロットにて検出した。

結果および考察

1. NRF3 は 20S プロテアソーム会合因子 *POMP* を直接転写する。

プロテアソームは、ユビキチン鎖を認識し基質タンパク質を ATP 依存的に巻き戻す 19S 複合体と、ペプチド結合活性を有している 20S プロテアソームから構成されている。また 20S プロテアソームは、複数の会合因子によって効率的に組み上げられている［1］。NRF3 と同じ CNC ファミリー転写因子である NRF1 は、これらプロテアソーム構成因子や会合因子の大部分を発現誘導することが知られている［2］。そこで NRF3 がこれら構成因子あるいは会合因子の発現誘導を介している可能性を検討した。樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール GFP 過剰発現の各 H1299 細胞から ISOGEN Ⅱを用いてトータル RNA を精製した後、各トータル RNA から M-MLV RTase を用いて cDNA 合成し、各プロテアソームサブユニット遺伝子プライマーと SYBR Premix Ex Taq Ⅱによってリアルタイム qPCR を行った。その結果、NRF3 過剰発現によって 20S プロテアソーム会合因子の一つである *POMP* の mRNA 量が増加していることを見出した（図 1A）。

NRF3 は抗酸化剤応答配列（ARE）に結合する転写因子である［3］。*POMP* 遺伝子の転写開始点付近に ARE 様配列が存在していたことから、NRF3 が当該配列に結合して *POMP* 遺伝子の転写を直接誘導しているのかを ChIP-qPCR 解析によって調べた。NRF3 過剰発現細胞およびコントロール GFP 過剰発現細をホルマリン固定後に溶解し、抗 NRF3 抗体を結合させたビーズを加え免疫沈降を行った。抗体ビーズを洗浄、脱クロスリンク、タンパク質除去し、NRF3 が結合したゲノム DNA を抽出する。その後、各ゲノム領域プライマーと SYBR Premix Ex Taq Ⅱによってリアルタイム qPCR を行った結果、当該 *POMP*-ARE における有意な NRF3 結合が確認できた（図 1B）。この結果を厳密に検証するため、NRF3 過剰発現細胞の *POMP*-ARE 配列に CRISPR/Cas9 システムを用いて変異導入した（図 1C）。その結果、NRF3 過剰発現しているにも関わらず当該 ARE 変異によって POMP 発現上昇は消失した（図 1D）。以上の結果は、NRF3 が *POMP* 遺伝子の転写を直接誘導することを示している。

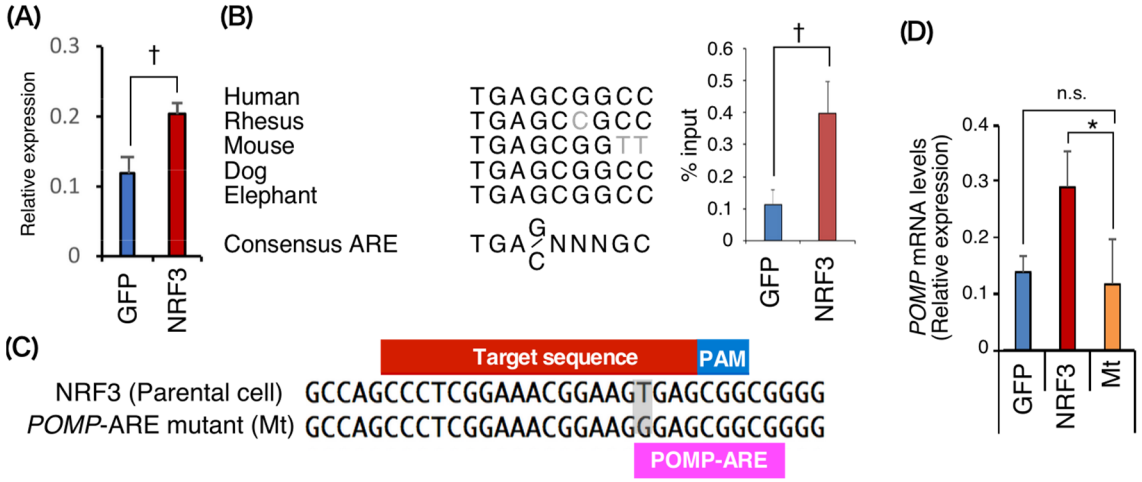


図 1. NRF3 による 20S プロテアソーム会合因子 *POMP* の転写制御解析

(A) *POMP* 遺伝子のリアルタイム qPCR。† $p < 0.01$（Mean±SD、n = 3、t-test）。

(B) *POMP* プロモーター ARE 配列の種間保存性（左）および NRF3 ChIP-qPCR 解析（右）。† $p < 0.01$（Mean±SD、n = 3、t-test）。

(C) CRISPR/Cas9 を用いた *POMP*-ARE 変異細胞株の樹立。ターゲット配列（赤）、PAM 配列（青）、POMP-ARE 配列（マゼンタ）。

(D) *POMP*-ARE 変異細胞を用いたリアルタイム qPCR。* $p < 0.05$, n.s. not significant（Mean±SD、n = 3、ANOVA-Tukey）。

2. NRF3 による POMP 転写誘導は 20S プロテアソームの活性上昇と腫瘍増大に寄与する。

次に、NRF3 による *POMP* 発現誘導が 20S プロテアソーム活性上昇におよぼす影響を検証した。コントロール GFP 過剰発現、NRF3 過剰発現、*POMP*-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各細胞を 10%～40%グリセロール密度勾配超遠心にて分画した後、各画分の蛍光プロテアソーム基質 Suc-LLVY の分解強度を測定した。その結果、NRF3 過剰発現による 20S プロテアソーム活性の上昇が、*POMP*-ARE 変異で完全に消失することを見出した（図 2A）。

さらに、NRF3-POMP 経路が腫瘍形成におよぼす影響を調べるため、コントロール GFP 過剰発現、NRF3 過剰発現、*POMP*-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各細胞を BALB/cAJcl-nu/nu マウスの腹側皮下に移植した。移植後 28 日目に腫瘍を摘出し重量を測定した結果、NRF3 過剰発現で増加した腫瘍重量が、*POMP*-ARE 変異で有意に減少することを見出した（図 2B）。

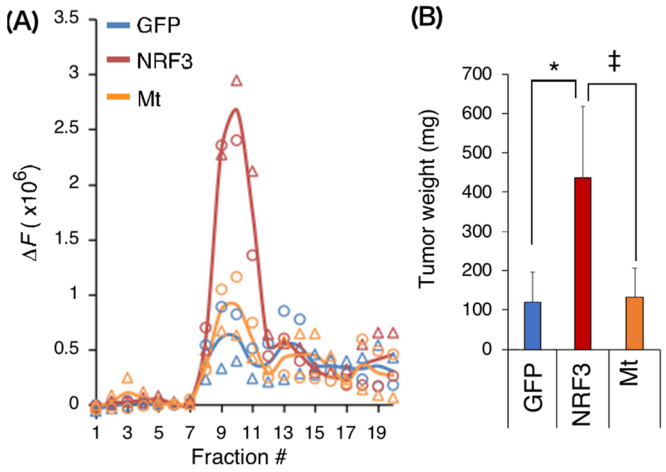


図 2. NRF3-POMP 経路の上昇が 20S プロテアソーム活性と腫瘍形成におよぼす影響

(A) *POMP*-ARE 変異細胞を用いた 20S プロテアソーム活性測定（n＝2）。各回の測定値を丸印および三角印でプロットし、平均値を実線で表示した。

(B) *POMP*-ARE 変異細胞を用いた腫瘍形成能試験。* $p < 0.05$, *‡ $p < 0.005$（Mean±SD、n＝7、 ANOVA-Tukey）。

(C) NRF3 による POMP-20S プロテアソーム会合促進を介した腫瘍増大メカニズム。

3. NRF3 はがん抑制因子 p53 および Rb タンパク質をユビキチン非依存的に分解する。

最後に、NRF3-POMP 経路で活性化する 20S プロテアソームの基質タンパク質を探索した。興味深いことに、がん抑制因子である p53 や Rb のタンパク質は NRF3 過剰発現で減少していた（図 3A、DMSO）。また NRF3 過剰発現は p53 や Rb の mRNA 量に影響しないことから（図 3B）、NRF3 は 20S プロテアソームを介してこれらがん抑制因子のタンパク質を分解していることが示唆された。

20S プロテアソームはユビキチン認識ユニットである 19S 複合体を持たないそこで次に NRF3 過剰発現による p53 および Rb タンパク質の減少がユビキチン非依存的であるのかを、ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いて検証した［4］。樹立済みだった NRF3 過剰発現およびコントロール GFP 過剰発現の各 HCT116 細胞を、10 μM TAK-243 もしくは DMSO（コントロール）含有培地で培養した。24 時間後、p53 と Rb のタンパク質および mRNA 量をウエスタンブロットによって検出した結果、ユビキチン化阻害条件下においても NRF3 過剰発現による p53 および Rb タンパク質低下が観察された（図 3A、TAK-243）。

以上の結果から、NRF3 は POMP の転写誘導を介して 20S プロテアソーム会合を促進し、がん抑制因子である p53 や Rb タンパク質をユビキチン非依存的に分解することで、がん増悪に寄与している可能性を見出した（図 3C）。

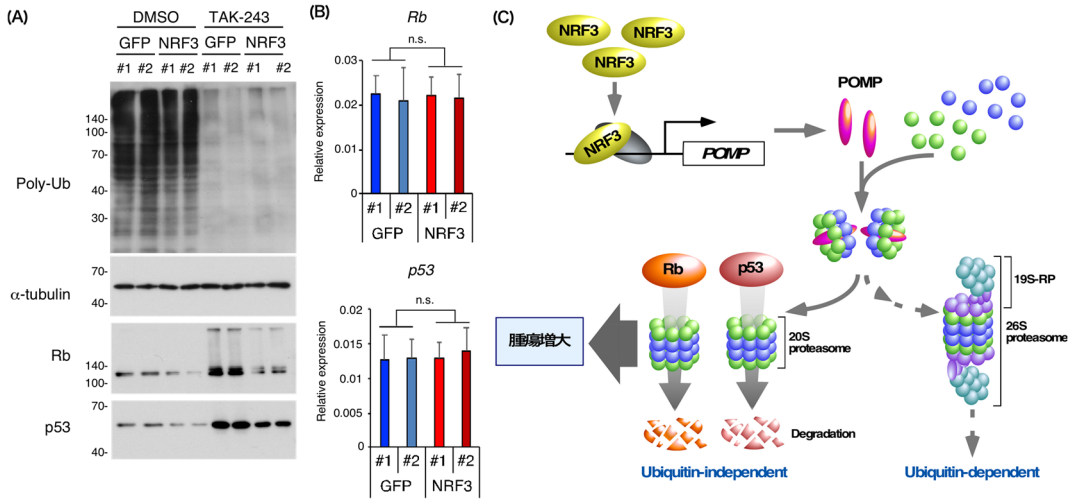


図 3. NRF3 過剰発現が p53 および Rb タンパク質のユビキチン非依存的分解へおよぼす影響

(A) NRF3 過剰発現細胞における p53 および Rb タンパク質のウエスタンブロット解析。
TAK-243 は 10 μM、24 時間で処理した。

(B) NRF3 過剰発現細胞における p53 および Rb タンパク質のウエスタンブロット解析。
†$p < 0.01$（Mean±SD、n = 3、t-test）。

(C) NRF3-POMP-20S プロテアソーム会合促進による腫瘍増大メカニズムのモデル図。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、同志社大学大学院生命医科学研究科遺伝情報研究室の小林聡、東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室の村田茂穂および濱崎純、日本医科大学先端医学研究所タンパク質間相互作用学部門の浜窪隆雄、京都大学 iPS 細胞研究所未来生命科学開拓部門の渡辺亮である（敬称略）。

本研究は、上原記念生命科学財団研究奨励金、JSPS 科研費（17K18234、16H03265）による研究費助成を受けて行った。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Feb;10(2):104-15. doi: 10.1038/nrm2630.

2) Radhakrishnan SK, Lee CS, Young P, Beskow A, Chan JY, Deshaies RJ. Transcription Factor Nrf1 Mediates the Proteasome Recovery Pathway after Proteasome Inhibition in Mammalian Cells. Mol Cell. 2010 Apr 9;38(1):17-28. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.029.

3) Kobayashi A, Ito E, Toki T, Kogame K, Takahashi S, Igarashi K, Hayashi N, and Yamamoto M. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. J Biol Chem. 1999 Mar 5;274(10):6443-52. doi: 10.1074/jbc.274.10.6443

4) Hyer ML, Milhollen MA, Ciavarri J, Fleming P, Traore T, Sappal D, Huck J, Shi J, Gavin J, Brownell J, Yang Y, Stringer B, Griffin R, Bruzzese F, Soucy T, Duffy J, Rabino C, Riceberg J, Hoar K, Lublinsky A, Menon S, Sintchak M, Bump N, Pulukuri SM, Langston S, Tirrell S, Kuranda M, Veiby P, Newcomb J, Li P, Wu JT, Powe J, Dick LR, Greenspan P, Galvin K, Manfredi M, Claiborne C, Amidon BS, Bence NF. A small-molecule inhibitor of the ubiquitin activating enzyme for cancer treatment. Nat Med. 2018 Feb;24(2):186-193. doi: 10.1038/nm.4474. Epub 2018 Jan 15.