

博士學位論文

NRF3 はアルギニンによる mTORC1 活性化を介して
腫瘍を増大させる

廣瀬 修平

同志社大学大学院
生命医科学研究科 医生命システム専攻
2020 年度 2003 番

指導教員
小林 聡 教授
和久 剛 准教授

2022 年 11 月

	目次	・・・ ページ
1.	序論	・・・ 1 ～ 5
1-1.	腫瘍微小環境における代謝リプログラミングと mTORC1の役割	・・・ 1
1-2.	転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 3 (NRF3) の がんにおける生理学的機能	・・・ 1 ～ 2
1-3.	転写因子 NRF3 の活性制御機構	・・・ 2 ～ 3
1-4.	mTORC1の生理学的機能	・・・ 3
1-5.	アミノ酸およびインスリンによるmTORC1の 活性制御機構	・・・ 3 ～ 4
1-6.	ラパマイシンによるmTORC1阻害	・・・ 4
1-7.	本研究の目的と概要	・・・ 4 ～ 5
2.	実験方法	・・・ 5 ～ 1 1
2-1.	細胞株・細胞培養	・・・ 5
2-2.	トランスフェクション	・・・ 5
2-3.	ウェスタンブロット	・・・ 6
2-4.	免疫染色	・・・ 6
2-5.	RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR)	・・・ 6 ～ 7
2-6.	クロマチン免疫沈降 (ChIP)	・・・ 7
2-7.	共免疫沈降	・・・ 7 ～ 8
2-8.	オートファジーフラックス解析	・・・ 8
2-9.	二分子蛍光相補法 (BiFC)	・・・ 8
2-10.	マクロピノサイトーシス解析	・・・ 8
2-11.	アポトーシス解析	・・・ 8 ～ 9
2-12.	移植マウスモデル	・・・ 9
2-12-1.	異種移植	
2-12-2.	同種移植	
2-13.	DNA マイクロアレイ解析	・・・ 9
2-14.	メタボローム解析	・・・ 9 ～ 1 0
2-14-1.	機器	
2-14-2.	カチオン性代謝物の分析	
2-14-3.	アニオン性代謝物の分析	
2-15.	生存曲線解析	・・・ 1 0

2-16. 統計処理	・・・ 10～11
3. 結果	・・・ 11～22
3-1. NRF3 はmTORC1活性化に寄与する	・・・ 11～12
3-1-1. NRF3 はmTORC1関連遺伝子の発現を制御する可能性がある	
3-1-2. NRF3 ノックダウンはmTORC1活性を低下させる	
3-1-3. NRF3 ノックダウンはオートファジーを誘導する	
3-2. NRF3 はmTORのリソソーム膜上への局在を誘導する	・・・ 12～13
3-2-1. NRF3 はアミノ酸によるmTORC1のリソソームへの局在を誘導することでmTORC1を活性化する	
3-2-2. NRF3 によるアミノ酸依存的なmTORC1のリソソーム局在はインスリンによるmTORC1への活性付与に必要である	
3-3. アルギニンはNRF3によるmTORC1活性化において重要なアミノ酸である	・・・ 13～14
3-3-1. ロイシンおよびアルギニンはNRF3によるmTORC1活性化に必要である可能性がある	
3-3-2. ロイシンセンサーであるSestrin2はNRF3によるmTORC1活性化に重要ではない	
3-3-3. アルギニンはNRF3によるmTORC1活性化に重要なアミノ酸である	
3-4. NRF3 はアルギニン欠乏に応答して活性化する	・・・ 14～15
3-4-1. NRF3 はアミン欠乏に応答して切断され核移行する	
3-4-2. アミノ酸欠乏はDDI2の二量体化を促進する	
3-5. NRF3 はアルギニン刺激に応答してSLC38A9およびRagCの発現を誘導することでmTORC1を活性化する	・・・ 15～17
3-5-1. NRF3 はアミノ酸刺激下でRagCおよびSLC38A9の発現を誘導する	
3-5-2. NRF3 はSLC36A1の発現制御を介してSLC38A9の発現を誘導する可能性がある	
3-5-3. NRF3 はRagCおよびSLC38A9の発現制御を介してmTORC1を活性化する	
3-5-4. NRF3 は通常培養下でもRagC、SLC38A9、SLC36A1の発現を制御する	

3-6.	NRF3 は RAB5 を介したマクロピノサイトーシスと SLC7A1 を介した輸送によってアルギニン供給を促進する	・・・ 17～18
3-6-1.	NRF3 は RAB5 を介したマクロピノサイトーシスによって mTORC1 を活性化する	
3-6-2.	NRF3 は SLC7A1 を介した選択的アルギニン輸送によって mTORC1 を活性化する	
3-7.	NRF3-mTORC1 軸の阻害はミトコンドリア機能を障害しがん細胞の生存を低下させる	・・・ 19～21
3-7-1.	NRF3 はグルコース代謝経路を制御する可能性がある	
3-7-2.	NRF3-mTORC1 軸はアミノ酸刺激下においてミトコンドリア機能の維持に重要である	
3-7-3.	NRF3-mTORC1 軸は通常培養において DRP1 の S637 のリン酸化によってミトコンドリア機能を制御する可能性がある	
3-8.	NRF3-mTORC1 軸の活性化は腫瘍を増大させ予後不良と相関する	・・・ 21
3-9.	NRF3 は腫瘍微小環境において腫瘍免疫を調節する可能性がある	・・・ 21～22
4.	考察	・・・ 22～25
4-1.	本研究の総括	・・・ 22
4-2.	がんにおけるアルギニンの重要性	・・・ 22～23
4-3.	mTORC1 によるミトコンドリア制御の可能性	・・・ 23～24
4-4.	アミノ酸欠乏による DDI2 の構造変化	・・・ 24
4-5.	NRF 転写因子と mTORC1 の階層性	・・・ 24
4-6.	がん微小環境における NRF3 の重要性	・・・ 25
5.	結言	・・・ 26
6.	謝辞	・・・ 27
7.	参考文献	・・・ 28～34
8.	図表 (図 1～53、表 1～2)	・・・ 35～93

1. 序論

1-1. 腫瘍微小環境における代謝リプログラミングと mTORC1 の役割

腫瘍微小環境はがん細胞、間質細胞、免疫細胞などの細胞成分とコラーゲンやサイトカイン、グルコースやアミノ酸などの栄養素といった非細胞成分からなる (図 1) (Lyssiotis and Kimmelman, 2017)。がん細胞はその環境の中で免疫細胞による攻撃から逃れつつ、急速かつ持続的な細胞増殖のために多量の栄養素を必要とする。しかし、腫瘍微小環境では血管から遠ざかるほどに低栄養状態になっており、そのような環境に適応するためにがん細胞は細胞内代謝をリプログラミングしている (図 1) (Ward and Thompson, 2012)。mechanistic/mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) はリソソーム膜上に存在するセリン / スレオニンキナーゼ複合体であり、細胞内の栄養状態を感知し、細胞増殖を制御している (Dibble and Manning, 2013)。興味深いことに mTORC1 阻害剤であるラパマイシンはがんの進展を抑制することが報告されており (Vignot et al., 2005)、がんの代謝リプログラミングにおける mTORC1 の重要性が示唆されている。一方で、ラパマイシンはがん細胞の増殖を抑制するものの、免疫細胞の活性化も抑制する効果があり、がん免疫の観点から見ると腫瘍促進性であることが指摘されている (Law, 2005)。以上から mTORC1 シグナルの複雑なネットワークのさらなる理解が必要であるが、アミノ酸レベルに応答した mTORC1 のタンパク質レベルでの活性制御は明らかになってきているものの、転写レベルでの制御は報告が乏しい。

1-2. 転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 3 (NRF3) のがんにおける生理学的機能

NRF3 は 1999 年に cap'n'collar (CNC) ファミリー転写因子の一つとして同定された (Kobayashi et al., 1999a) (図 2)。Nrf3 は胎盤で発現が高いものの、ノックアウトマウスが表現型を示さないため (Derjuga et al., 2004)、その生理学的機能は長らく未解明であった。また後述するように NRF3 はストレス誘導性の転写因子であると考えられているが、その生理的な活性化シグナルは解明されていない (図 3)。そのような状況の中で、近年、当研究室をはじめとして様々な研究室が、がん細胞における NRF3 の機能を報告している。具体的には NRF3 がさまざまながん組織で高発現しており (図 4)、大腸がんでは (adenomatous polyposis coli) APC の遺伝子変異に起因する WNT/ β -Catenin 経路の活性化によって発現亢進している (図 5) (Aono et al., 2019)。また、NRF3 ががん抑制タンパク質である p53 やレチノブラストーマ (Rb) のプロテアソームによる分解を介してがんを進展させることも報告している (図 5) (Waku et al., 2020a)。さらに、他の研究グループが膵がんおよび甲状腺がんにおける NRF3 の転移

促進機能を報告している (Wang et al., 2017, Wang et al., 2018)。最近では、当研究室で NRF3 がコレステロール生合成の主要な調節因子である sterol-responsive element-binding protein 2 (SREBP2) を活性化すると同時に、RAB5 の発現制御を介してエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスを介した細胞外からのコレステロールの取り込みを促進することを報告している (図 5) (Waku et al., 2021)。一方で、脂肪酸代謝の主要な調節因子である SREBP1 は mTORC1 シグナルを介して NRF3 のホモログである NRF1 の遺伝子発現を誘導することが報告されている (Zhang et al., 2014)。これらの知見から NRF3 ががんの代謝制御と mTORC1 シグナルに関連することが示唆されるが、その詳細は未解明であった。

1-3. 転写因子 NRF3 の活性制御機構

CNC ファミリーには p45/NF-E2、NRF1、NRF2、NRF3、BACH1、BACH2 が属している (Motohashi et al., 2002) (図 2)。CNC ファミリー転写因子は、DNA 結合ドメインとして CNC 型の塩基性ロイシンジッパー (bZip) を持っており、MAFK や MAFF などの小 Maf 因子群とヘテロ二量体を形成する (Motohashi et al., 2002)。これらの転写因子は標的遺伝子プロモーター上の抗酸化応答配列 (antioxidant response element; ARE) や MAF 認識配列 (MAF recognition elements; MAREs) を認識して転写を調節する (Motohashi et al., 2002)。CNC ファミリーの中でも NRF3 はタンパク質の構造上 NRF1、NRF2 と相同性が高く (Chevallard and Blank, 2011)、NRF3 の活性制御メカニズムは NRF1 の知見を基に明らかにされてきている。NRF3 タンパク質は N 末端から順に N-terminal homology box 1 (NHB1) ドメイン、N-terminal homology box 2 (NHB2) ドメイン、CNC/bZip ドメインを持つ (Kobayashi et al., 1999)。膜貫通領域を持つ NHB1 ドメインを介して小胞体膜に繋がれており、Synoviolin (HRD1) によってポリユビキチン鎖が付加され、valosin containing protein (VCP) によってプロテアソームに運ばれ分解されている。細胞がプロテアソーム阻害などの刺激を受けると、NRF3 はアスパラギン酸プロテアーゼである DNA damage-inducible a homolog 2 (DDI2) によるプロセッシングを受け、NHB2 ドメインで切断される (Chowdhury et al., 2017a)。それにより活性化した NRF3 は MAFK や MAFF などの小 Maf 群とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター上の ARE に結合し転写を活性化する (図 3) (Kobayashi et al., 1999)。核内では β -Transducin repeat containing protein (β -TRCP) によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される (Chowdhury et al., 2017)。また、NRF3 のホモログである NRF1 は NRF3 と同様に活性制御されており、NGLY1 による脱糖鎖やポリユビキチン鎖が DDI2 による切断に必要であることが示唆されている (Dirac-Svejstrup et al., 2020; Lehrbach et al., 2019)。

一方、NRF3 関連因子であり酸化ストレス応答の遺伝子発現を制御する NRF2 の活性制御機構については、非酸化ストレス下で NRF2 は細胞質でユビキチン転移酵素のアダプター / 酸化ストレスセンサータンパク質である Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) および E3 ユビキチン転移酵素である Cullin3 (CUL3) と複合体を形成し、プロテアソームによって分解されている (Kobayashi et al., 2006)。酸化ストレスや親電子性物質などの刺激にさらされると、KEAP1 のシステイン残基が酸化修飾され構造が変化する (Itoh et al., 2004)。それにより、NRF2 を分解を逃れ、グルタチオン合成酵素などの抗酸化ストレスに関連する遺伝子の発現を誘導する (Yamamoto et al., 2018)。以上のように NRF3 は NRF1/NRF2 と同様にストレス誘導性転写因子であると推察されるが、具体的な生理的刺激は未解明な点が多い。

1-4. mTORC1の生理学的機能

mTORC1はmTOR、RAPTOR、PRAS40、mLST8、DEPTORからなるタンパク質複合体である。それに対し、mTORC2はmTOR、RICTOR、mSin、mLst8、Protor1/2、DEPTORからなるタンパク質複合体である。どちらもセリン / スレオニンキナーゼ活性を持つが、その標的タンパク質は異なっている。mTORC1はp70 ribosomal protein S6 kinase (S6K)、4E-binding protein 1 (4E-BP1)、unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1)などをリン酸化し (図6)、mTORC2はAKTやPKCをリン酸化する。mTORC1はタンパク質や脂質、核酸など、細胞の構成成分の生合成といった同化反応を促進する一方で、オートファジーといった異化反応を抑制する (図6) (Ben-Sahra et al., 2016; Hara et al., 1998; Hosokawa et al., 2009; Matsubara et al., 2012; Porstmann et al., 2008)。具体的には、mTORC1はS6Kと4E-BP1のリン酸化を介してタンパク質合成を促進する (Hara et al., 1998)。また、細胞増殖に必要な脂質を供給するために、Lipin1のリン酸化を介してコレステロール生合成を活性化する (Peterson et al., 2011)。さらに、mTORC1はc-MYCやhypoxia inducible factor 1 (HIF1)の発現および活性制御を介してグルコース代謝を酸化的リン酸化から解糖系にシフトすると同時に、核酸合成のためにペントースリン酸経路を活性化する (Du et al., 2010)。それに加えて、ミトコンドリアの品質管理にも重要である (Sikstro et al., 2013)。一方で、unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1)のリン酸化を介してオートファジーを抑制する (Hosokawa et al., 2009)。つまり、mTORC1は細胞内の異化・同化のバランスを制御することで細胞増殖に寄与している (図6)。

1-5. アミノ酸およびインスリンによる mTORC1 の活性制御機構

mTORC1活性は栄養状態やストレスなどの環境に応じてリソソーム膜上に存在する

Ras homolog enriched in brain (Rheb) と Rag GTPaseファミリーによって調節されている (図7) (Sancak et al., 2008, 2010; Saucedo et al., 2003)。Rhebの活性はGAP活性を持つ tuberous sclerosis complex 1 および 2 (TSC1/2) によって制御されている。一方で、Rag GTPaseファミリーは RagA または RagB (RagA/B) と RagC または RagD (RagC/D) がヘテロ二量体を形成しており、その Rag 複合体はヘテロ六量体の足場タンパク質である Ragulator およびアルギニントランスポーターである SLC38A9 によってリソソーム膜に繋ぎ留められている (Sancak et al., 2010)。Rag-Ragulator 複合体はアミノ酸 (特にロイシンおよびアルギニン) に応答して、mTORC1 のリソソーム膜上への誘導を促進する (Bar-Peled et al., 2013; Wang et al., 2015; Wolfson et al., 2016)。具体的には、ロイシンは細胞質で Sestrin2 と GATOR2 の結合を阻害し、それにより GAP 活性を持つ GATOR1 が抑制され、RagA/B が GDP 結合型に変化するのを阻害することで mTORC1 との親和性が上昇する。アルギニンは SLC38A9 によって感知され構造変化を起こす。それにより、Ragulator-SLC38A9 が GEF 活性を持ち、RagA/B を GTP 結合型にすることで mTORC1 との親和性を増加させる。RagC/D は GAP 活性を持つ folliculin-FNIP によって GDP 結合型に変化し、mTORC1 との親和性が上昇する。なお、RagC/D に対する GEF 活性を持つ分子は不明である。それらのアミノ酸による mTORC1 のリクルートに続いてインスリンなどの増殖因子が PI3K-AKT のリン酸化を介した TSC1/2 の阻害によって Rheb の GTP 結合を促進し mTORC1 にリン酸化活性を付与する (図7)。以上のように mTORC1 活性化のタンパク質レベルでの分子メカニズムは明らかにされてきているが、mTORC1 の活性制御メカニズムを、各因子の転写という視点で解析した研究はほとんど存在しない。

1-6. ラパマイシンによる mTORC1 阻害

mTORC1 阻害剤であるラパマイシンは *Streptomyces hygroscopicus* から単離されたマクロライド化合物の一種である。ラパマイシンは細胞内で FKBP prolyl isomerase 1A (FKBP12) と複合体を形成し、その複合体は mTOR タンパク質の FRB ドメインに結合することで mTORC1 の活性を阻害する。ラパマイシンは IL-2 シグナル伝達を抑制することによる免疫抑制作用をもち、臓器移植の拒絶予防に使用されてきた (Mukherjee and Mukherjee, 2009)。また、マウスにおいて寿命延長効果があることが報告されている (Harrison et al., 2009)。さらに近年、がん細胞の増殖抑制効果も報告されており臨床研究が進められている (Vignot et al., 2005)。

1-7. 本研究の目的と概要

本研究は、NRF3 のがんにおける生理的意義を明らかにすることを目的として行い、

NRF3 がアルギニン欠乏誘導性の転写因子である可能性を見出し、アルギニン依存的なmTORC1活性化を介して腫瘍を増大させることを発見した。具体的には、NRF3はアルギニンレベルに応じてSLC38A9およびRagCの発現を制御することでmTORC1のリソソーム膜上へのリクルートを誘導することを明らかにした。さらに、NRF3はmTORC1活性化のために、非選択的なマクロピノサイトーシスや選択的なアミノ酸トランスポーターによるアルギニン取り込みを活性化することも示した。メタボローム解析からNRF3とグルコース代謝の関連が示唆され、NRF3-mTORC1軸はミトコンドリア機能の維持およびがん細胞の生存に寄与することを明らかにした。それと一致してNRF3-mTORC1軸の増強は腫瘍を増大させ、いくつかのがん種において予後不良となることを明らかにした。最後に、Nrf3による腫瘍微小環境での免疫抑制の可能性を示した。これらの結果は、今まで未解明であったNRF3の活性化ストレスおよび転写レベルでのmTORC1活性制御を明らかにするとともに、NRF3のアルギニン依存的なmTORC1活性化を介したがんの代謝や進展への寄与を示している。

2. 実験方法

2-1. 細胞株・細胞培養

HCT116細胞およびDLD-1細胞（ヒト大腸癌）はDMEM/高グルコース培地（Wako Pure Chemical Industries）で培養した。H1299細胞（ヒト肺癌）およびPK-45H細胞（ヒト膵臓癌）は、RPMI-1640培地（Nacalai Tesque）で培養した。すべての培地は、10% FBS（Nichirei Bioscience）、40 µg/mLストレプトマイシン、40 units/mLペニシリン（Wako Pure Chemical Industries）を添加し、37°C、5% CO₂インキュベーターで培養した。NRF3およびGFPを安定的に発現するH1299細胞（H1299-oeNRF3/H1299-oeGFP）は、以前に作製した（Waku et al., 2020a）。Nrf3ノックダウンおよびコントロールノックダウンRenCa細胞（RenCa_shNrf3/RenCa_shCtrl）はNrf3およびコントロールターゲット配列を挿入したpiGENE hU6プラスミドとピューロマイシン耐性プラスミドを共トランスフェクションし、10 µg/mlピューロマイシンで薬剤選択した（TJEM）。GFP-LC3-RFP-LC3Gプローブ（Kaizuka et al., 2016）を安定的に発現するHCT116細胞を作製するために、HCT116細胞をpMRX-IP-GFP-LC3-RFP-LC3Gをトランスフェクションし、1 µg/mlピューロマイシンで薬剤選択した。

2-2. トランスフェクション

プラスミドDNAおよびsiRNAのトランスフェクションはそれぞれpolyethylenimineおよびRNAiMAX（Invitrogen）で行った。siRNAの配列は表1で示した。

2-3. ウェスタンブロット

NRF3 タンパク質を抽出するために、細胞を1×SDSサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH6.8]、10% グリセロール、1% SDS) で溶解し、DNA を剪断するために超音波処理した後、2% 2-メルカプトエタノールを加え95°Cで5分間煮沸した。

NRF3 以外のタンパク質抽出では、細胞を RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.6]、50 mM フッ化ナトリウム、10 mM NaCl、10 mM ピロリン酸ナトリウム、10 mM β-グリセロリン酸、1 mM EDTA、10% グリセロール、1% NP-40、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Nacalai Tesque))で溶解した。細胞溶解液を4°C、13,000 rpm で10分間遠心し、5×SDS サンプルバッファーと2% 2-メルカプトエタノールを加え、95°Cで5分間煮沸した。ただし、SLC36A1およびSLC38A9タンパク質の検出のために、細胞溶解液を PNGase F (New England Biolabs) と反応させて脱糖鎖処理し、5×SDS サンプルバッファーを添加し、95°Cでの煮沸は行わずに使用した。タンパク質量は BCA キット (Wako Pure Chemical Industries) を用いて測定した。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (Sigma-Aldrich) に転写した。適切なブロッキング液を用いて室温で1時間ブロッキングおよび TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7.6]、137 mM NaCl、0.1% Tween20) で洗浄した後、メンブレンを一次抗体溶液と4°Cで一晩以上反応させ、TBS-Tで洗浄した。次に、メンブレンを horseradish peroxidase 標識二次抗体 (Invitrogen) と室温で1時間反応させ、TBS-Tで洗浄した。ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare) と反応させ、X線フィルム RX-U (FUJIFILM) に露光して CEPROS SV (FUJIFILM) で検出した。使用した抗体は表2に示した。

2-4. 免疫染色

カバーガラスに接着した細胞を4% paraformaldehyde で37°C、15分間固定し、PBSで3回洗浄した後、ブロッキング溶液(1% BSA、0.3% Triton X-100 in PBS)で1時間ブロッキング・透過処理をした。一次抗体液と4°C、1日間反応させ、PBSで3回洗浄した後、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647 標識した二次抗体 (Invitrogen) と室温1時間反応させた。このとき、核は4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Dojindo Molecular Technologies) で染色した。PBSで3回洗浄した後、mounting medium (Dako) で封入し、共焦点顕微鏡 (LSM900、Zeiss) で画像を取得した。共局在定量解析は ImageJ の Mander's coefficient プラグインで行った。使用した抗体は表2に示した。

2-5. RNA抽出および定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR)

細胞を ISOGEN II (NIPPON GENE) に溶解し、製品プロトコルにしたがって RNA の抽出および精製を行った。1 μ g RNA を pd (N)6 random primer (Takara Bio)、murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen)、250 mM deoxy nucleoside triphosphate (Takara Bio) を用いて製品プロトコルに従い逆転写した。cDNA に SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) とプライマーを混合し、Thermal Cycler Dice Real-Time System (Takara Bio) で RT-qPCR を行った。各遺伝子の発現量は β -actin の発現量で補正した。用いたプライマーの配列は表 1 に示した。

2-6. クロマチン免疫沈降 (ChIP)

この実験は、以前の報告に基づいている (Waku et al., 2021)。細胞を 1 μ M MG-132 (Peptide Institute) で 16 時間処理し、1%ホルムアルデヒドで室温で 10 分間固定した後、グリシンを加えて最終濃度を 0.125 M にした。プロテアーゼ阻害剤を加えた細胞溶解バッファー (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 85 mM KCl, 0.5% NP-40) で細胞を溶解し、2000 rpm, 4°C で 3 分間遠心した。ペレットをさらに、プロテアーゼ阻害剤入りの核溶解バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS) を用いて溶解した後、超音波処理した。15,000 rpm、8°C で 10 分間遠心分離後、上清を回収し ChIP 希釈バッファー (16.7 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1% TritonX-100, and 0.01% SDS) に希釈した後、20 μ l の Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific) で前洗浄した。次に、上清を 3 μ g の抗 NRF3 抗体 (RCB4901) (Chowdhury et al., 2017a) とインキュベートし、20 μ L の Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific) と反応させた。低塩洗浄緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, および 0.1% SDS)、高塩洗浄緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 0.1% SDS)、LiCl 洗浄緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% deoxycholate sodium, and 1% NP-40) の順で洗浄し、最後に 1 ml の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], and 1 mM EDTA) で 2 回洗浄した。100 μ l の溶出バッファー (50 mM NaHCO₃ および 1% SDS) を加えて免疫複合体を溶出させ、200 mM NaCl を加えて脱架橋した後、残ったタンパク質をプロテイナーゼ K で消化した。最後に標的領域に特異的なプライマーを用いて RT-qPCR を行った。使用したプライマー配列は表 1 に示した。

2-7. 共免疫沈降

この実験は以前に報告されている方法を基にしている (Wolfson et al., 2016)。細胞に指定されたプラスミド DNA をトランスフェクションし、翌日指定されたアミノ酸刺激処理をした。細胞を Triton lysis buffer (40 mM HEPES [pH 7.4], 10 mM β -glycerol

phosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 2.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail) で溶解し、4 °C、13,000 rpm で10分間遠心して上清を回収した。50%スラリー FLAG M2 アフィニティーゲルを Triton lysis buffer で3回洗浄した後、細胞溶解液に加え、4 °Cで2時間振盪した。Triton lysis buffer で1回洗浄した後、500 mM NaClを加えた Triton lysis buffer で3回洗浄した。免疫沈降したサンプルに等量の 2× SDS sample buffer を加え、ウエスタンブロットを行った。

2-8. オートファジーフラックス解析

この実験は以前に報告されている方法を基にしている (Kaizuka et al., 2016)。GFP-LC3-RFP-LC3ΔG を安定発現する HCT116 細胞に指定された siRNA をトランスフェクションし、2日後に蛍光顕微鏡 (LX71, Olympus) を用いた画像取得およびフローサイトメトリー (FACS Aria II, BD Bioscience) を用いた GFP および RFP の蛍光強度の測定を行った。

2-9. 二分子蛍光相補法 (BiFC)

この実験は以前の報告に基づいている (Waku et al., 2016)。N末端/C末端 Venus-DDI2ΔUBL を発現するプラスミドを作成するために、DDI2cDNA を pBiFC-VN173 (addgene) および pBiFC-VC155 (addgene) にクローニングした。各 BiFC プラスミドに加えて pmCherry-N1 プラスミド (Clontech) を内部標準としてトランスフェクションした。翌日、アミノ酸欠乏培地で3時間培養した。Venus および mCherry の蛍光強度をフローサイトメトリーで計測し、mCherry 陽性細胞における Venus 蛍光の中央値を算出した。

2-10. マクロピノサイトーシス解析

この実験は以前の報告を基にしている (Waku et al., 2021)。細胞に 100 μM EIPA またはコントロールとして DMSO で刺激し、1 mg/ml FITC-BSA (Invitrogen) を添加して1時間培養した。細胞を回収し FACS buffer (0.1% [w/v] sodium azide and 2% FBS in cold PBS) で2回洗浄し、500 μL FACS buffer に再懸濁した。その後、FITC の蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

2-11. アポトーシス解析

この実験は MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit) (MBL International) を用いて製品プロトコルにしたがって行った。回収した細胞を Annexin V-FITC (AV) および propidium iodide (PI) を含む Binding buffer で再懸濁した。室温で15分間反応させた後、

フローサイトメーターで測定した。AV 陽性 /PI 陰性を早期アポトーシス、AV 陽性 /PI 陽性を後期アポトーシスとした。

2-12. 移植マウスモデル

2-12-1. 異種移植

この実験は以前の報告を基にしている (Waku et al., 2020a)。 1×10^7 個の H1299-oeNRF3 または H1299-oeGFP 細胞を 4 週齢の雌 BALB/cAJcl-Foxn1^{nu} マウス (CREA Japan) に皮下移植した。1 週間後、ラパマイシン (LC Laboratory) を 1.5 mg/kg または 3.0 mg/kg で 2 日に 1 回腹腔投与を開始した。腫瘍体積は $1/2 \times [\text{長辺}] \times [\text{短辺}]^2$ で算出した。3 週間後、腫瘍を摘出し重量を測定した。

2-12-2. 同種移植

この実験は以前の報告を基にしている (Waku et al., 2022)。 5×10^5 個の RenCa_shNrf3 または RenCa_shCtrl 細胞を 4 週齢の雌 BALB/cCrSlc マウス (SHIMIZU Laboratory Supplies) または BALB/cAJcl-Foxn1^{nu/nu} (CLEA Japan) に皮下移植した。3 週間、腫瘍体積を計測しつつ飼育した後、腫瘍を摘出し重量を測定した。なお、腫瘍体積の算出は上記と同様に行った。

2-13. DNA マイクロアレイ解析

この実験は以前の報告を基にしている (Waku et al., 2020a)。Renca-shNrf3 または shCtrl 細胞を移植し、4 週間後に摘出した腫瘍組織から抽出した RNA を用いた。製品プロトコルにしたがい、RNA を Ambion WT Expression Kit (Affymetrix) を用いて断片化・標識し、GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization Kit (Affymetrix) で Affymetrix Clariom S mouse array に相補結合させた。マイクロアレイの工程は、GeneChip fluidics station 450 を使用し、蛍光シグナルは GeneChip scanner 3000-7 G で検出した。また、DNA マイクロアレイの全遺伝子の発現データは、Transcription Analysis Console (Affymetrix) を用いて取得した。

2-14. メタボローム解析

2-14-1. 機器

キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (CE-TOFMS) は Agilent 7100 capillary electrophoresis (Agilent Technologies)、Agilent 6230 LC/MSD TOF (Agilent Technologies)、Agilent 1100 series binary HPLC pump、G1603A Agilent CE-MS adapter-G1607A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit で行った。陰イオン性代謝物の検出では、Agilent stainless ESI needle を Agilent G7100-60041 platinum ESI needle (Soga et al., 2009) に変更して実施した。

システム操作とデータ取得は Agilent MassHunter Workstation で行い、データ解析は Keio MasterHands software で行った。なお、本実験は慶應大学との共同研究で実施した。

2-14-2. カチオン性代謝物の分析

電解質として 1 M ギ酸を満たしたシリカキャピラリー (内径 50 μ m \times 全長 100 cm) を用いて分離を行った (Soga et al., 2003, Soga et al., 2006)。試料溶液約 5 nl を 50 mbar で 5 秒間注入し、30 kV の電圧をかけた。キャピラリーの温度は 20 $^{\circ}$ C に保ち、サンプルトレイは 5 $^{\circ}$ C 以下に冷却した。0.01 μ M Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene を含むメタノール / 水 (50% v/v) をシース液として 10 μ L/min で送液した。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) / 飛行時間型質量分析 (TOFMS) は陽イオンモードで行い、キャピラリー電圧は 4000 V に設定した。加熱乾燥窒素ガス (ヒーター温度 300 $^{\circ}$ C) の流量は 7 psig に維持した。TOFMS では、フラグメンター、スキマー、Oct RFV 電圧は、それぞれ 75 V、50 V、500 V に設定した。各スペクトルの自動再較正は、標準物質の質量を用いて行った。プロトン化メタノール二量体の 13 C 同位体イオン ($[2\text{MeOH}+\text{H}]^+$ 、m/z 66.0631) および Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 、m/z 622.0290) から精密質量測定用のロックマスを決定した。

2-14-3. アニオン性代謝物の分析

市販の COSMO(+) (chemically coated with cationic polymer) キャピラリー (内径 50 μ m \times 全長 105 cm) (Nacalai Tesque) を用い、電解質として 50 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 8.5) を用いた (Sato et al., 2017; Soga et al., 2009)。試料溶液 30 nl を 50 mbar で 30 秒間注入し、-30 kV の電圧をかけた。酢酸アンモニウム (5 mM) を 0.01 μ M Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene を含むメタノール / 水 (50% v/v) に溶解した溶液をシース液として 10 μ L/min で送液した。ESI-TOFMS はマイナスイオンモードで行い、キャピラリー電圧は 3,500 V に設定した。TOFMS では、フラグメンター電圧は 100 V、スキマー電圧は 50 V、Oct RFV 電圧は 500 V に設定した。脱プロトン化酢酸二量体の 13 C 同位体イオン ($[2\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}]$ 、m/z 120.0384) および Hexakis + 脱プロトン化酢酸 (m/z 680.03554) から精密質量測定用のロック質量決定した。

2-15. 生存曲線解析

臨床解析は、ウェブサーバー GEPIA2 を用いて行った (Tang et al., 2019)。

2-16. 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。2 群間および複数群間の比較には、それぞれ Welch's t-test および一元配置分散分析 (ANOVA)、Tukey's test を用いた。メタボ

ロミクスデータの統計解析およびエンリッチメント解析は、メタボロミクスデータ解析専用の総合プラットフォームである MetaboAnalyst を用いた (Xia et al., 2009)。

3. 結果

3-1. NRF3 は mTORC1 活性化に寄与する

3-1-1. NRF3 は mTORC1 関連遺伝子の発現を制御する可能性がある

NRF3 が 20S プロテアソームのシャペロン POMP の発現誘導を介して腫瘍増大させることが明らかにされているが、さらに NRF3 によるがんにおける生理機能の全容を解明するために、まず NRF3 がガン細胞において発現制御する遺伝子群の網羅的な解析を行った。当研究室が以前行ったヒト大腸がん細胞 HCT116-siRNA による NRF3 ノックダウン (HCT116-siNRF3)、コントロール (HCT116-siCtrl) の DNA マイクロアレイデータセット (Waku et al., 2021) を用いて gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。GSEA は全遺伝子を対象に発現量の差分からランク付けする閾値を用いない、バイアスのない解析である。結果として、NRF3 発現が「mTORC1 シグナル」遺伝子セットと正の相関を示した (図 8 A & 8 B)。同様の結果は、他のヒト肺がん細胞データセット H1299-NRF3 過剰発現 (H1299-oeNRF3) およびコントロール GFP 過剰発現 (H1299-oeGFP) でも得られた (図 8 C & 8 D)。以上の GSEA から、NRF3 は mTORC1 シグナル伝達系を転写レベルで制御している可能性が強く示された。

3-1-2. NRF3 ノックダウンは mTORC1 活性を低下させる

そこで NRF3 と mTORC1 シグナル伝達系との相関を詳細に調べるために、HCT116 細胞に対して siNRF3 トランスフェクションが mTORC1 活性に与える影響を調べたところ、NRF3 ノックダウンにより mTORC1 活性化のマーカーである S6K のリン酸化レベル (p-S6K) が低下することを見出した (Hara et al., 1998) (図 9)。ここで siNRF3 のトランスフェクションにより、NRF3 関連遺伝子である NRF1 および NRF2 の mRNA レベルに変化がないことを確認した (図 10)。このことから、NRF3 ノックダウンによる上記の効果は、NRF1 および NRF2 に対するオフターゲットによるものではないことが示された。さらに、他のがん細胞においても NRF3 による mTORC1 活性の制御が存在するかを調べるために、NRF3 が内在的に高く発現しているヒトがん細胞株 (大腸癌 DLD-1、膵臓癌 PK-45H 細胞、H1299 細胞) を用いた。結果として、これらのがん細胞でも NRF3 ノックダウンにより p-S6K レベルが低下した (図 11)。以上から、複数のがん細胞において、NRF3 は mTORC1 活性化に寄与していることを

明らかにした。

3-1-3. NRF3 ノックダウンはオートファジーを誘導する

NRF3 による S6K リン酸化亢進に続き、他の mTORC1 活性指標を調べるため、mTORC1 の活性化によって抑制されるオートファジーへの影響を検討した (Hosokawa et al., 2009)。オートファジーフラックス解析は GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G プローブ (Kaizuka et al., 2016) を用いた。このプローブは細胞内で翻訳後直ちに GFP-LC3 と RFP-LC3 Δ G に切断され、GFP-LC3 はオートファジーの基質として、RFP-LC3 Δ G は細胞内コントロールとして機能する。結果として、NRF3 のノックダウンにより GFP/RFP 比が減少し、オートファジー活性化、すなわち mTORC1 不活性化を示すことがわかった (図 1 2)。これらの結果は、NRF3 が mTORC1 活性化に関与していることを示している。

3-2. NRF3 は mTOR のリソソーム膜上への局在を誘導する

3-2-1. NRF3 はアミノ酸による mTORC1 のリソソームへの局在を誘導することで mTORC1 を活性化する

アミノ酸欠乏後の再刺激 (以下、欠乏と再刺激のセットを「刺激」と呼ぶ) により、mTORC1 活性化が強く誘導されることが知られている (Hara et al., 1998)。そこで、NRF3 による mTORC1 活性化にアミノ酸刺激が重要であるかどうかを検討した。アミノ酸刺激により p-S6K レベルが増加したが、NRF3 ノックダウンによりアミノ酸依存的な p-S6K レベルの増加は抑制された (図 1 3)。さらに、DLD-1、H1299、PK-45H といった他のがん細胞においても、NRF3 ノックダウンによってアミノ酸依存的な p-S6K レベルが減少した (図 1 4)。アミノ酸刺激は、mTORC1 をリソソーム表面へ局在させることで活性化の起点となる (図 7) (Sancak et al., 2008)。そこで、NRF3 がアミノ酸刺激による mTORC1 のリソソームへの局在を制御しているかどうかを調べた。まず、mTOR とリソソームマーカーとして lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) に対する抗体を用いて免疫染色を行った (Carlsson et al., 1988; Viitala et al., 1988) (図 1 5)。mTOR タンパク質はアミノ酸欠乏下で LAMP1 タンパク質とほとんど共局在していなかったが (AA-dep.)、アミノ酸再刺激に反応して LAMP1 タンパク質と mTOR タンパク質の共局在が増強された (図 1 5、siCtrl, AA-dep.→AA-res.)。一方で、NRF3 ノックダウンによりこの共局在は消失した (図 1 5、siNRF3, AA-dep.→AA-res.)。これらの免疫染色の結果は、NRF3 がアミノ酸刺激に反応して mTOR のリソソームへ局在を促進することを示しており、上記の p-S6K の結

果と一致している (図 1 3)。

3-2-2. NRF3 によるアミノ酸依存的な mTORC1 のリソソームへの局在はインスリンによる mTORC1 への活性付与に必要である

アミノ酸刺激に応答してリソソーム表面にリクルートされたmTORC1は、インスリン-Rheb シグナルによってキナーゼ活性が付与されることで最終的に活性化する (図 7)。そこで、NRF3 によるアミノ酸依存的なmTORC1活性化に対するインスリン刺激の影響を検討した。HCT116-siCtrl細胞または siNRF3 細胞をアミノ酸および血清不含培地にて培養した後、アミノ酸再刺激およびインスリン刺激を行った。siCtrl 細胞では、アミノ酸とインスリン刺激の両方がS6Kのリン酸化に重要であることがわかった (図 1 6、 siCtrl)。一方、NRF3 をノックダウンすると、アミノ酸とインスリンの存在下で、S6Kのリン酸化が減少した (図 1 6、 siNRF3)。これらの結果は、NRF3 によるアミノ酸依存的なmTORC1のリソソームへの局在が、インスリン刺激によるmTORC1活性化にまで影響を与えることを示している。

3-3. アルギニンは NRF3 による mTORC1 活性化において重要なアミノ酸である

3-3-1. ロイシンおよびアルギニンは NRF3 による mTORC1 活性化に必要である可能性がある

次に、どのアミノ酸がどのように NRF3 依存的なmTORC1活性化をもたらすのかを調べた。これまでの研究で、ロイシンとアルギニンがmTORC1の活性化に特に重要であることが報告されている (図 7) (Hara et al., 1998; Yao et al., 2008)。そこで、NRF3 によるmTORC1活性化におけるこれらのアミノ酸の重要性を検討した。ロイシンおよびアルギニン欠乏後に両方で再刺激すると p-S6K レベルは増加したが、NRF3 ノックダウンはその p-S6K レベルの増加を抑制した (図 1 7)。このことから、NRF3 によるmTORC1活性化においてもロイシンとアルギニンが重要であることが示唆された。

3-3-2. ロイシンセンサーである Sestrin2 は NRF3 による mTORC1 活性化に重要ではない

ロイシンは Sestrin2 に結合し、Sestrin2 を GAP activity toward Rag 2 (GATOR2) 複合体から解離させることでmTORC1を活性化する (図 7) (Wolfson et al., 2016)。また、グルタミンはロイシン取り込みの交換基質として作用することで細胞質ロイシンレベルを上昇させ、mTORC1を活性化する (Nicklin et al., 2009)。そこで、ロイシンおよびグルタミン (ロイシン / グルタミン) の刺激が Sestrin2 タンパク質の GATOR2 複合体

からの解離に与える影響について検討するため、GATOR2複合体の構成要素である WDR24 に FLAG タグを融合したタンパク質を発現するプラスミドを用いて、共免疫沈降実験を行った (Bar-Peled et al., 2013)。アミノ酸欠乏下で、FLAG-WDR24 タンパク質と結合する Sestrin2 タンパク質を確認し (図 1 8、レーン 3)、続くアミノ酸再刺激により結合する Sestrin2 タンパク質が減少し、p-S6K レベルが増加した (図 1 8、レーン 3 vs. 4)。同様の結果は、ロイシン / グルタミンの再刺激によっても得られた (図 1 8、レーン 3 vs. 5)。しかし予想外にも、NRF3 ノックダウンはアミノ酸またはロイシン / グルタミンの再刺激による FLAG-WDR24 からの Sestrin2 の解離に影響を与えなかったことから (図 1 8、レーン 6 vs. 7, 8)、ロイシンおよびグルタミンは NRF3 による mTORC1 活性化にとって重要なアミノ酸ではない可能性があることが示唆された。

3-3-3. アルギニンは NRF3 による mTORC1 活性化に重要なアミノ酸である

次に、NRF3 による mTORC1 活性化におけるアルギニンの寄与を調べるために、アルギニンの単独刺激を行った。NRF3 ノックダウンによりアルギニン依存的な p-S6K レベルの上昇が消失し (図 1 9 A)、さらに重要なことに、NRF3 ノックダウンによってアルギニン刺激による mTOR と LAMP1 の共局在も減弱した (図 1 9 B)。これらの結果は、NRF3 がアルギニンを利用して mTORC1 のリソソームへのリクルートを促進する可能性を示している。この詳細な分子機構について、以降のセクションでさらに検討した。

3-4. NRF3 はアルギニン欠乏に応答して活性化する

3-4-1. NRF3 はアルギニン欠乏に応答して切断され核移行する

NRF3 タンパク質は小胞体膜に位置し、その後プロテアソームによって分解される (図 3)。細胞が MG-132 などのプロテアソーム阻害剤やストレスを受けると、NRF3 タンパク質は切断され、核に移行して転写が活性化される (図 3) (Chowdhury et al., 2017a)。しかし、生理的ストレスによる NRF3 の活性化は未だ報告がないが、本研究からアミノ酸、特にアルギニンレベルに応答している可能性が示唆される。アミノ酸刺激に応じた内在性 NRF3 タンパク質の切断を調べたが、NRF3 タンパク質が分解されてしまい検出できなかった (データ未掲載)。そこで、NRF3 を過剰発現させた H1299-oeNRF3 細胞を用い、MG-132 処理に応答して外因性 NRF3 タンパク質がプロセシングされ、核移行することを確認した (図 2 0、MG-132)。次に、この細胞株を用いてアミノ酸刺激が NRF3 タンパク質の切断に与える影響について検討した。そ

の結果、アミノ酸刺激により、切断され核移行した NRF3 タンパク質が増加することが分かった (図 2 0、 AA stimulation)。その後、アルギニン刺激下でも検討したところ、同様の結果が得られた (図 2 0、 Arg stimulation)。前述したように「刺激」は「欠乏」と「再刺激」のセットと定義している。そこで、欠乏と再刺激のうち、どの処理が NRF3 の活性化に重要かを検討した。その結果、アミノ酸やアルギニン欠乏の時点で NRF3 タンパク質は切断され、再刺激の時点でも保たれていることが明らかになった (図 2 1 A)。最後に、切断された NRF3 タンパク質が核移行していることを確認するため、免疫染色を行なった。その結果、アミノ酸またはアルギニンの枯渇が NRF3 タンパク質の核内移行を増加させることを確認し (図 2 1 B)、アミノ酸、特にアルギニン欠乏が、NRF3 タンパク質の切断及び核移行における重要な因子であることが示唆された。

3-4-2. アミノ酸欠乏は DDI2 の二量体化を促進する

次に、NRF3 タンパク質を切断するアスパラギン酸プロテアーゼである DDI2 に対するアミノ酸またはアルギニン枯渇の影響を調べた (Chowdhury et al., 2017a)。DDI2 は、ユビキチン様 (UBL) ドメインとレトロウイルスプロテアーゼ様 (RVP) ドメインを持つ。また、DDI2 はホモ二量化により活性部位が形成される (Sivá et al., 2016)。興味深いことに、FLAG-またはHA-DDI2を発現する 2 つのプラスミドを用いた共免疫沈降実験から、アミノ酸の欠乏により FLAG-DDI2 と HA-DDI2 間の相互作用が増加した (図 2 2 A、Full)。同様の結果は、UBL を欠失した DDI2 を用いても得られた (図 2 2 A、 Δ UBL)。また、Venus 蛍光タンパク質断片を用いた二分子蛍光相補法 (BiFC) から、生細胞においてもアミノ酸欠乏に応答して DDI2 の相互作用が増加することを確認した (図 2 2 B)。これらの結果は、アミノ酸の欠乏が DDI2 の二量体化とそれに続く NRF3 タンパク質切断のトリガーになっていることを示唆している。最後に、アミノ酸欠乏による NRF3 核移行の DDI2 依存性を調べた。その結果、上述の結果と一致して、DDI2 ノックダウンによってアミノ酸またはアルギニン欠乏による NRF3 の核移行が減弱することを明らかにした (図 2 3)。以上の結果は、アミノ酸欠乏による DDI2 の二量体化によって、NRF3 タンパク質の切断・核移行が促進することを示している。

3-5. NRF3 はアルギニン刺激に応答して SLC38A9 および RagC の発現を誘導することで mTORC1 を活性化する

3-5-1. NRF3 はアミノ酸刺激下で RagC および SLC38A9 の発現を誘導する

次に、アミノ酸依存的なmTORC1活性化に必要な NRF3 標的遺伝子を検討した。Sestrin2 は細胞質におけるロイシンセンサーとして、SLC38A9はリソソームにおけるアルギニンセンサーとしてmTORC1活性化に寄与する（図7）（Wang et al., 2015）。また、SLC38A9はRagulatorと複合体を形成し、アルギニンによって活性化にされると RagA/B からのGDP放出を促進することが報告されている（図7）（Shen and Sabatini, 2018）。RagA/B はGTP結合型、RagC/D はGDP結合型のときにmTORとの親和性が強くなることでリソソーム表面へのリクルートをもたらす（図7）（Sancak et al., 2008）。NRF3 はアルギニン依存的なmTORC1活性化に関わることを示されていることから、NRF3 が上記のアルギニン依存的なmTORC1活性化に重要なSLC38A9、RagA、RagB、RagC、RagD の5つのRagulator関連遺伝子を制御していることが示唆される。RT-qPCRの結果、NRF3 ノックダウンにより、アミノ酸またはアルギニン刺激下でSLC38A9および RagC のmRNAレベルが有意に減少した（図24）。また、SLC38A9と RagC 遺伝子のプロモーター領域にはAREが含まれており、そこには NRF3 のヘテロ二量体パートナーであるMAFKのChIP-seqピークが存在していた（図25A）。そこで、H1299-oeNRF3 または oeGFP細胞を用いて、ChIP-qPCR解析を行った。その結果、NRF3 は RagC 遺伝子プロモーターのARE領域に結合する可能性が示されたが、予想外にもSLC38A9遺伝子プロモーターには結合しなかった（図25B）。

3-5-2. NRF3 は SLC36A1 の発現制御を介して SLC38A9 の発現を誘導する可能性がある

以前の研究で、SLC38A9タンパク質はリソソーム表面でSLC36A1タンパク質と相互作用し、これらのトランスポーターは互いの遺伝子発現レベルを高めることが報告されている（Wang et al., 2021）。さらに、SLC36A1遺伝子のプロモーター領域にはAREが含まれており、そこには NRF3 のヘテロ二量体パートナーであるMAFKのChIP-seqピークが存在していることも確認した（図25A）。そこで、NRF3 はSLC36A1の発現制御を介して、間接的にSLC38A9の発現を制御すると仮説を立てた。予想通り、NRF3 ノックダウンにより、アミノ酸やアルギニン刺激下でSLC36A1の遺伝子発現が低下し（図26）、SLC36A1遺伝子プロモーターのARE領域に NRF3 が結合する可能性が示された（図25B）。これらの結果から、NRF3 は直接 RagC の発現を誘導する一方で、SLC36A1の直接的な遺伝子発現を介して間接的にSLC38A9の発現を誘導していることが示唆された。

3-5-3. NRF3 は RagC および SLC38A9 の発現制御を介して mTORC1 を活性化する

アミノ酸によるmTORC1活性化におけるRagCおよびSLC38A9の依存性を確認するため、siRNAによるノックダウンを行なった。その結果、NRF3ノックダウンと同様に、SLC38A9またはRagCをノックダウンによってもアミノ酸刺激下でのp-S6Kレベルが低下することを確認した(図27)。そこでさらに、NRF3によるmTORC1活性化がRagCおよびSLC38A9を介しているかを確認するために、SLC38A9およびRagC遺伝子の発現が低下しているHCT116-siNRF3細胞に各遺伝子のプラスミドをトランスフェクションし、発現を回復させる実験を行った。その結果、アルギニン刺激下でのNRF3ノックダウンにより低下したp-S6Kレベルは、SLC38A9およびRagC両遺伝子を導入したときに回復した(図28)。これらの結果は、NRF3がSLC38A9とRagCの遺伝子発現を誘導し、それによりアルギニン依存的にmTORC1を活性化することを示している。

3-5-4. NRF3 は通常培養下でも RagC、SLC38A9、SLC36A1 の発現を制御する

3-1-2 (図9)で示したように、NRF3は通常培養下でもmTORC1活性を制御する。そこで、非アミノ酸刺激下でのNRF3標的遺伝子を調べた。その結果、アミノ酸刺激がなくとも、NRF3ノックダウンによってSLC38A9、RagC、SLC36A1の発現がmRNAおよびタンパク質レベルで減少した(図29&30)。したがって、アミノ酸刺激を行っていない状態でもNRF3ノックダウンによりp-S6Kレベルが低下するという結果から(図9)、NRF3はこれらの遺伝子発現を介して基底状態のmTORC1活性にも寄与していることが示唆される。

3-6. NRF3 は RAB5 を介したマクロピノサイトーシスと SLC7A1 を介した輸送によってアルギニン供給を促進する

3-6-1. NRF3 は RAB5 を介したマクロピノサイトーシスによって mTORC1 を活性化

エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスは、細胞外タンパク質やアミノ酸を非選択的に取り込み、それを栄養としてmTORC1を活性化するのに重要であることが報告されている(Commisso et al., 2013; Wyant et al., 2017)。当研究室での最近の研究では、NRF3がマクロピノサイトーシスを誘導し、細胞外タンパク質や脂質の取り込みを促進することを示している(Waku et al., 2021)。本研究では、アミノ酸刺激下でのNRF3によるマクロピノサイトーシスの誘導を蛍光分子を融合した基質であるFITC-BSAの取り込みを指標に調べた。その結果、NRF3ノックダウンによってFITCの蛍光強度が低下することを確認し(図31)、NRF3がアミノ酸刺激下でも

マクロピノサイトーシスを誘導することが示唆された。次に、NRF3がmTORC1活性化においてマクロピノサイトーシスを利用するかを確かめるために、NRF3をロックダウンまたはマクロピノサイトーシスを阻害し、細胞をアミノ酸およびFBS欠乏培地で培養した後、BSAで刺激した。その結果、BSA刺激によってp-S6Kレベルは増加し、マクロピノサイトーシス阻害剤であるEIPAおよびNRF3ロックダウンによってその増加は消失した(図3 2 A)。同様の結果は、アミノ酸またはアルギニン刺激下でも得られた(図3 2 B & 3 2 C)。さらに、BSAおよびアミノ酸依存的なp-S6Kレベルの増加は、どちらもNRF3の過剰発現によりさらに増強されるという一貫した結果が得られた(図3 3)。これらの結果は、マクロピノサイトーシス誘導が、NRF3が細胞外のタンパク質およびアミノ酸を利用してmTORC1活性化するのに重要であることを示している。以前、当研究室ではRAB5A、RAB5B、RAB5Cを含むRAB5を、マクロピノサイトーシスを誘導するNRF3標的遺伝子として同定している(Waku et al., 2021)。そこで本研究でも、NRF3はRAB5を介したマクロピノサイトーシスによってmTORC1活性化に寄与すると考えた。予想通り、アミノ酸またはアルギニン刺激下でNRF3ロックダウンによりRAB5遺伝子の発現量が減少した(図3 4)。また、RAB5ロックダウンによってBSAまたはアルギニン依存的なp-S6Kレベルの増加が減弱することを確認した(図3 5)。したがって、NRF3はRAB5を介したマクロピノサイトーシスを誘導することでmTORC1活性化のためのアミノ酸を供給することが明らかになった。

3-6-2. NRF3はSLC7A1を介した選択的アルギニン輸送によってmTORC1を活性化する

細胞外からアミノ酸を供給する経路として、マクロピノサイトーシス以外に選択的なトランスポーターが考えられる。そこで細胞外からアルギニンを取り込む可能性のある5つのアミノ酸トランスポーターSLC7A1、SLC7A2、SLC7A3、SLC7A9、SLC6A14に着目した。これらトランスポーター遺伝子のうち、NRF3ロックダウンによってSLC7A1の遺伝子発現のみが減少し(図3 6 A)、SLC7A1プロモーターのARE領域へのNRF3の結合も認められた(図3 6 B & 3 6 C)。この結果から、NRF3によるアミノ酸依存的なmTORC1活性化において、SLC7A1が関与していることが示唆された。そこで、この点を検証するためにsiSLC7A1によるロックダウンを行った(図3 7 A)。その結果NRF3ロックダウンと同様に、SLC7A1ロックダウンによりアミノ酸またはアルギニンの刺激によって増加するp-S6Kレベルが減少することが確認された(図3 7 B & 3 7 C)。したがって、これらの結果はNRF3がSLC7A1を介した選択的輸送を誘導し、mTORC1活性化のためにリソソームへのアル

ギニン供給を促進していることを示唆している。

3-7. NRF3-mTORC1軸の阻害はミトコンドリア機能を障害しがん細胞の生存を低下させる

3-7-1. NRF3 はグルコース代謝経路を制御する可能性がある

mTORC1は様々な代謝プロセスを制御している。そこで、NRF3-mTORC1軸が代謝制御に与える影響を調べるために、HCT116-siNRF3/siCtrl細胞、あるいはH1299-oeNRF3/oeGFP細胞のメタボローム解析を行った。まず、HCT116-siNRF3細胞およびsiCtrl細胞はアミノ酸刺激を行い、H1299-oeNRF3細胞およびoeGFP細胞はアミノ酸刺激なしで培養を行った。そして、各細胞の代謝物データを3セット取得した。クラスター解析および主成分分析(PCA)により、各細胞の3サンプル間で良好な再現性が示された(図38)。続いて、対照サンプル間で有意に変化した代謝物を探索し、HCT116-siNRF3/siCtrl細胞間では82種類の代謝物に変化し、H1299-oeNRF3/oeGFP細胞間では120種類の代謝物に変化していた(図39A)。これらの代謝物のうち、55種類は共通しており(図39B)、なかでも解糖系、ペントースリン酸経路(PPP)、TCAサイクルなど、ワールブルグ効果に関連するいくつかのグルコース代謝経路に集中していた(図39C&39D)。このことから、NRF3はミトコンドリアおよびTCAサイクルを含むグルコース代謝経路を制御する可能性が示唆された。

3-7-2. NRF3-mTORC1軸はアミノ酸刺激下においてミトコンドリア機能の維持に重要である

解糖系-TCAサイクルは細胞内ATP産生の中心である(Koppenol et al., 2011)。そこで、アミノ酸刺激下でのATP産生におけるNRF3の役割を検証するために、ルシフェラーゼ発光を利用したアッセイを用いて、細胞内のATP量を測定した。アミノ酸刺激下では、NRF3ノックダウンにより細胞内ATP量が減少し、これはmTORC1阻害剤であるラパマイシンによる処理と同様の結果であった(図40)。続いて、mTORC1活性はミトコンドリア機能維持に必要であると報告されていることから(図7)

(Sikstro et al., 2013)、ミトコンドリアによるATP産生に重要なミトコンドリア膜電位(MMP)を調べた。CMXRosはカチオン性蛍光色素であり、MMPの負電荷依存的にミトコンドリア内部に濃縮される。このMMP指標を用いて、NRF3ノックダウンまたはラパマイシン処理により、アミノ酸またはアルギニン刺激下でのCMXRosの蛍光強度が低下することを明らかにした(図41A)。そこでさらに、プラスミドを用いてSLC38A9およびRagCを発現させると、NRF3ノックダウンによるMMPの低下

が回復した (図 4 1 B)。

ミトコンドリア機能はミトコンドリアの伸長・断片化といったダイナミクスと密接に関連している。具体的には、飢餓などのストレスを受けるとミトコンドリアは伸長し、さらにストレスを受けると断片化されアポトーシスが誘導される (Shutt and McBride, 2013)。そこで NRF3 によるミトコンドリアの形態への影響について TOM20 抗体を用いた免疫染色で調べた結果、アミノ酸刺激下における NRF3 ノックダウンまたはラパマイシン処理によってミトコンドリアは断片化した (図 4 2 A & 4 2 B、siCtrl vs. siNRF3、 siCtrl vs. Rapamycin)。同様の結果は NRF3 標的遺伝子である SLC38A9 および RagC のノックダウンでも観察された (図 4 2 A、 siCtrl vs. siSLC38A9、 siCtrl vs. siRagC)。また、以上の結果と一致して、細胞内 ATP/AMP 比の低下をトリガーとする AMPK のリン酸化 (p-AMPK) も NRF3 ノックダウンや mTORC1 阻害によって増加した (図 4 3)。

上述したようなミトコンドリア機能の障害はアポトーシスを引き起こす可能性が考えられる (Green and Reed, 1998)。そこで次に、Annexin V-FITC (AV) および propidium iodide (PI) を用いたフローサイトメトリー解析によってアポトーシス細胞を検出した。予想通り、NRF3 ノックダウンによってアミノ酸刺激下での初期アポトーシス細胞 (AV+/PI-) および後期アポトーシスまたはネクローシス細胞 (AV+/PI+) が増加した (図 4 4、 siCtrl vs. siNRF3)。同様の結果は、SLC38A9 または RagC のノックダウンまたはラパマイシン処理によっても得られた (図 4 4、 siCtrl vs. siSLC38A9、 siCtrl vs. siRagC、 siCtrl vs. Rapamycin)。したがって、これらの結果は、NRF3-mTORC1 軸がミトコンドリア機能を維持し、がん細胞外の環境で変動するアミノ酸レベルに適応していることを示唆している。

3-7-3. NRF3-mTORC1 軸は通常培養において DRP1 の S637 のリン酸化によってミトコンドリア機能を制御する可能性がある

NRF3 は非アミノ酸刺激下、すなわち通常培養においても mTORC1 活性を制御する (図 9)。そこで、アミノ酸刺激がない状態で NRF3、SLC38A9、RagC のノックダウンまたはラパマイシン処理を行なった。その結果、ミトコンドリアは伸長し (図 4 5 A)、p-AMPK レベルは増加した (図 4 5 B)。これらの結果は、上述の NRF3 が基底状態の mTORC1 活性にも寄与しているという推察と一致して (図 9)、NRF3-mTORC1 軸によるミトコンドリア制御が正常条件下でも存在することを示唆している。

最後に、NRF3-mTORC1 軸によってミトコンドリアのダイナミクス関連遺伝子である Mitofusin 1 (MFN1)、Mitofusin 2 (MFN2)、Optic Atrophy 1 (OPA1)、Dynamin-related protein 1 (DRP1) の発現が制御されるかどうかを調べた (Westermann, 2010)。し

かし、NRF3 ノックダウンやラパマイシン処理によって、遺伝子の発現に影響を与えなかった (図 4 6 A)。同様に、mTORC1 活性化によって増加し、ミトコンドリア分裂に寄与すると報告のある mitochondrial fission process 1 (MTFP1) のタンパク質レベルも変化がなかった (図 4 6 B) (Morita et al., 2017)。一方、ミトコンドリア分裂に重要である DRP1 の機能を負に調節する S637 のリン酸化レベルは (Cereghetti et al., 2008; Cribbs and Strack, 2007)、NRF3 ノックダウンやラパマイシン処理によって増加したことから (図 4 6 B)、DRP1 のリン酸化が NRF3-mTORC1 軸によるミトコンドリア制御に関与していることを示唆している。

3-8. NRF3-mTORC1 軸の活性化は腫瘍を増大させ予後不良と関連する

3-7-2 で示したアポトーシス解析の結果から (図 4 4)、NRF3-mTORC1 軸はがん細胞の生存に重要であることが示された。予想通り、アミノ酸刺激下でのがん細胞の *in vitro* での増殖が、NRF3、SLC38A9、RagC のノックダウンおよびラパマイシン処理によって減少することを複数のがん細胞株で確認した (図 4 7 A)。また、アルギニン刺激下でも同様の結果が得られた (図 4 7 B)。

さらに、NRF3-mTORC1 軸の *in vivo* での腫瘍形成への影響を確認するために、H1299-oeNRF3/oeGFP 細胞を免疫不全マウスへ皮下移植し、ラパマイシンを腹腔投与した。その結果、NRF3 依存的に腫瘍が増大し、それはラパマイシン投与により抑制された (図 4 8)。

最後に、がん患者の予後と本研究で着目した NRF3-mTORC1 遺伝子群 (NRF3、RagC、SLC36A1、SLC38A9、RAB5A、RAB5B、RAB5C、SLC7A1) の発現との臨床的関連性を検証した。The Cancer Genome Atlas に存在する 33 種類のがんのうち、副腎皮質がん (ACC)、脳低悪性度グリオーマ (LGG)、肝細胞がん (LIHC)、中皮腫 (MESO)、膵管腺癌 (PAAD) 患者の全生存率または無病生存率は、NRF3-mTORC1 遺伝子群の発現レベルと負の相関があった (図 4 9 A)。同様に、これらのがん患者のカプラン・マイヤープロットから、NRF3-mTORC1 遺伝子群の発現レベルが高いほど予後が悪いことが明らかになった (図 4 9 B)。これらの結果は、がん進展における NRF3-mTORC1 軸の病態生理学的な重要性を示している。

3-9. NRF3 は腫瘍微小環境において腫瘍免疫を調節する可能性がある

腫瘍微小環境におけるがん細胞の mTORC1 活性化は、腫瘍免疫による排除からの回避をもたらす。そこで NRF3 の腫瘍微小環境における役割を調べるために、野生型マウスへの同系移植を行った。まず、マウス腎がん RenCa 細胞に shRNA を導入することで、安定的 Nrf3 ノックダウン (RenCa_shNrf3) およびコントロール (RenCa_shCtrl)

細胞を樹立し、Nrf3の発現を確認した(図5 0 A)(Waku et al., 2022)。これらの細胞を野生型マウスに皮下移植した結果、Nrf3ノックダウンによって腫瘍は退縮した(図5 0 B-5 0 D)(Waku et al., 2022)。次に、摘出した腫瘍からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。GSEAの結果、RenCa_shNrf3では免疫応答に関連する遺伝子セットが集中していたことから(図5 1)(Waku et al., 2022)、Nrf3はがん微小環境において免疫による排除からの逃避に関わる可能性が示唆される。そこで、Nrf3ノックダウンによる腫瘍退縮におけるT細胞依存性を調べるために、T細胞が欠如したマウス(ヌードマウス)にRenCa_shCtrl細胞およびRenCa_shNrf3細胞を皮下移植した。その結果、上述した野生型マウスへの移植実験とは対照的に、Nrf3ノックダウンによる腫瘍退縮効果は見られなかった(図5 2)。以上の結果から、がん細胞におけるNrf3はT細胞による抗腫瘍免疫からの逃避に寄与することを示唆している。

4. 考察

4-1. 本研究の総括

がん細胞ではmTORC1が活性化しており、細胞外環境変化への適応と急激な増殖を可能にする。本研究では、CNCファミリー転写因子であるNRF3によるアルギニン依存的なmTORC1の活性化機構が、がん進展に関与していることを示した(図5 2)。アルギニンが欠乏すると、NRF3はRagC、SLC38A9、SLC36A1の遺伝子発現を直接的、または間接的に誘導し、アルギニン再刺激に応じてmTORC1のリソソーム上へのリクルートを引き起こす。そして、アルギニン依存的にmTORC1を活性化するために、NRF3はRAB5を介したマクロピノサイトーシスと、SLC7A1を介した選択的輸送によって、アルギニンのリソソームへの供給も促進する。続いて、メタボローム解析により、NRF3はワールブルグ効果に関連したグルコース代謝のリプログラミングに関与している可能性が示唆された。さらに、NRF3-mTORC1軸を阻害すると、細胞内ATPが減少し、ミトコンドリア膜電位欠損によるアポトーシスが誘導されることがわかった。このように、NRF3-mTORC1軸の発現増加は腫瘍の成長を促進し、がん患者の生存率と負の相関を示した。結論として本研究は、アルギニンによるmTORC1活性化におけるNRF3の生理的役割を明らかにし、それはがん進展に繋がることを示した。ここで、これらの知見ががん細胞のアルギニン依存性やミトコンドリアの品質管理に与える影響について考察した。そして、アルギニンによるNRF3の活性化機構の可能性と、NRF1、NRF2、NRF3によるmTORC1シグナルの複雑な制御機構について議論した。

4-2. がんにおけるアルギニンの重要性

アルギニンは、クレアチン、ポリアミン、一酸化窒素、尿素を合成するために必要な非必須アミノ酸である (Morris, 2006)。通常、食物からのアルギニンに加えて、尿素サイクルを通じてアスパラギン酸およびシトルリンからも合成される (Wu et al., 2009)。しかし、一部のがん細胞は細胞内で十分なアルギニンを合成できないことが報告されている。(Patil et al., 2016年)。例えば、細胞外のアルギニンをシトルリンに代謝する酵素であるアルギニンデアミナーゼ (ADI) を処理することにより、肝細胞癌およびメラノーマの *in vitro* および *in vivo* 増殖が減少する知見を得ている (Ensor et al., 2002)。実際、リコンビナント ADI タンパク質は、アルギニン要求性の高い肝細胞癌、メラノーマ、およびいくつかのがん種の治療のために臨床試験が行われている (Ascierto et al., 2005)。つまり、これらの知見は、がん細胞は細胞外のアルギニンに依存していることを示している。また、本研究では、NRF3 がマクロピノサイトーシスとトランスポーターによる輸送の両方を誘導することで、mTORC1 活性化に必要なアルギニンを供給することを見出した。さらに、NRF3-mTORC1 軸はミトコンドリアの機能維持に重要であることも見出している。このように、NRF3 は細胞外アルギニンに依存しているがん細胞において、アミノ酸の取り込み促進とミトコンドリア機能維持という重要な役割を持つと推察される。この問題を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

4-3. mTORC1 によるミトコンドリア制御の可能性

ミトコンドリアは、ATP を生成する主な動力源であるだけでなく、細胞の生存とアポトーシスの中枢でもある (Green and Reed, 1998)。ミトコンドリアの品質は、融合と分裂のバランスを調整することによって管理されており、細胞分裂の際にはミトコンドリアは適切に分裂し分配される (Westermann, 2010)。本研究では、NRF3 ノックダウンおよびラパマイシン処理によりアミノ酸刺激下でミトコンドリア機能が低下し、ミトコンドリアの断片化が起こるとともに、アポトーシス細胞が増加することを明らかにした。これは、mTORC1 によるミトコンドリア機能の制御に関するこれまでの知見と一致している (Ramanathan and Schreiber, 2009)。また、アミノ酸刺激のない培養条件での NRF3 ノックダウンおよびラパマイシン処理により、DRP1 タンパク質が Ser637 でリン酸化され、ミトコンドリアの分裂が阻害された (Cereghetti et al., 2008; Cribbs and Strack, 2007)。MTFP1 は mTORC1 シグナルによって翻訳が亢進するタンパク質で、DRP1 リン酸化の重要な調節因子である (Morita et al., 2017)。しかし、本研究では NRF3 ノックダウンおよび mTORC1 阻害によって MTFP1 タンパク質レベルが変化せず、NRF3-mTORC1 軸によるミトコンドリア形態の制御は DRP1 のリン酸化依存

的であるが、MTFP1 非依存的であることを示唆している。マイトファジーは、ミトコンドリア品質管理システムの一つであり、ダメージを受け機能不全になり断片化したミトコンドリアをオートファジーで分解する(Youle and Van Der Bliek, 2012)。最近、当研究室での他の研究により、NRF3 がオートファジー関連遺伝子の発現を誘導することを示している(投稿中)。これらの知見は、NRF3 ノックダウンやmTORC1活性抑制によってDRP1のリン酸化依存的に断片化したミトコンドリアが適切に分解されず、アポトーシスが誘導される可能性が考えられる。しかし、現在そのような報告はなく、この点については今後検討の余地がある。

4.4. アミノ酸欠乏による DDI2 の構造変化

また本研究から、アミノ酸、特にアルギニンの欠乏が NRF3 を活性化することが示唆され、それは DDI2 のノックダウンによって消失することが明らかになった。

DDI2 のRVPドメインは活性部位であり、UBLドメインはユビキチン結合能を持つことから、ユビキチンが結合した NRF3 を認識すると推察できる (Sivá et al., 2016)。アミノ酸の欠乏は DDI2 のホモ二量化を促進し、それはUBLドメインを欠損させた DDI2ΔUBLでも同様であった。以上から、アミノ酸欠乏による DDI2 の二量体化は活性部位であるRVPドメインを介していると推測できるが、その構造的な根拠は不明である。そこで、この問題を議論するために、DDI2-RVP と構造的に類似した HIV-1 プロテアーゼ (PR) に注目した。DDI2-RVP で保存されている PR のシステイン残基が PR の活性に重要であることが示されており、興味深いことに、PR 活性はグルタチオンやシステイン修飾によって制御されている (Davis et al., 1996, 1999)。アルギニン供給がグルタチオン合成を誘導することから (Petrović et al., 2009)、アルギニンがグルタチオンによるシステイン修飾を介して DDI2 ホモダイマー化を促進し、タンパク質切断と NRF3 の転写活性化をもたらすことを示唆している。

4.5. NRF転写因子と mTORC1 の階層性

mTORC1を活性化する NRF3 とは異なり、NRF1 および NRF2 はmTORC1によって活性化される。具体的には、mTORC1は SREBP1 を活性化し、それによって NRF1 の発現が誘導されプロテアソームの産生が促進される (Zhang, 2014)。また、mTORC1はオートファジーアダプタータンパク質である p62 をリン酸化し、kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)のオートファジーによる分解を促進することで NRF2 を活性化し、肝細胞がんが増殖することが報告されている (Ichimura et al., 2013)。以前、当研究室では NRF3 が翻訳制御因子である cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3 (CPEB3) を誘導することにより NRF1 の翻訳を抑制することを報告している

(Waku et al., 2020b)。さらに、NRF3はSREBP1と連関するSREBP2の転写活性化により脂質代謝のリプログラミングも行うことも報告している(Horie et al., 2013; Waku et al., 2021)。同様に、本研究ではアミノ酸刺激に応答してNRF3を介したmTORC1活性化を明らかにした。これらの知見は、これら3つのNRFによるmTORC1シグナルの複雑なネットワーク制御を示唆するものである。

4-6. がん微小環境におけるNRF3の重要性

がん微小環境はがん細胞、間質細胞、免疫細胞などの細胞成分とコラーゲンやサイトカイン、グルコースやアミノ酸などの栄養素といった非細胞成分からなる(図1)。がん細胞はmTORC1を介して解糖系を亢進させることで乳酸を産生し、細胞外pHを低下させる(Hujber et al., 2017)。それにより微小環境中の免疫細胞のアポトーシスが誘導され、がん細胞は免疫細胞による攻撃から逃れる(Fischer et al., 2007)。また、mTORC1はミトコンドリア機能を調節し、低栄養環境でのがん細胞の生存・増殖を可能にする(de la Cruz López et al., 2019)。さらに、がん微小環境ではしばしばアルギニン代謝酵素であるArg1が細胞外放出されることによってアルギニンが枯渇しており、それにより免疫細胞の活性化が抑制される(Rodriguez et al., 2004)。本研究で、NRF3は細胞外からのアルギニン取り込みを促進し、mTORC1を活性化することでミトコンドリア機能を維持することを明らかにした。さらに、野生型マウスへの移植実験から、Nrf3ノックダウンによって腫瘍は退縮し、そこでは免疫が活性化している可能性が示唆された。これらの知見からNRF3はがん微小環境におけるアルギニンの枯渇や栄養の独占利用によるがん免疫逃避を介してがん進展に寄与する可能性が示唆され、今後の研究が必要である。

5. 結言

本研究では、NRF3はmTORC1を転写レベルの制御によって活性化することを明らかにした。具体的には、NRF3はアルギニンレベルに応じてmTORC1のリソソーム表面へのリクルートを誘導した。それに加えて、マクロピノサイトーシスおよび選択的輸送による細胞外からのアルギニン取り込みを誘導した。このNRF3-mTORC1軸はミトコンドリア機能の維持とがん細胞の生存に寄与し、その活性化は生存率と逆相関することを明らかにした。さらに本研究では、Nrf3はがん免疫からの逃避をもたらす可能性も示した。

6. 謝辞

メタボローム解析の実験的支援をいただいた曾我朋義教授、佐藤清敏特任講師、佐藤紗綾博士、山中早苗博士、石川貴正博士（慶應義塾大学）、本研究の重要なアドバイスをいただいた中津海洋一准教授（名古屋市立大学）に心から感謝いたします。

また、アミノ酸欠乏培地をご供与いただいた大澤毅特任准教授（東京大学）に心より感謝申し上げます。

同志社大学遺伝情報研究室の小林聡教授、和久剛准教授には熱心なご指導をいただき、メンバーには有意義な議論をしていただきました。心より御礼申し上げます。

7. 参考文献

- Aono, S., Hatanaka, A., Hatanaka, A., Gao, Y., Hippo, Y., Taketo, M.M., Waku, T., and Kobayashi, A. (2019). β -catenin/TCF4 complex-mediated induction of the NRF3 (NFE2L3) gene in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 1–15.
- Ascierto, P.A., Scala, S., Castello, G., Daponte, A., Simeone, E., Ottaiano, A., Beneduce, G., De Rosa, V., Izzo, F., Melucci, M.T., et al. (2005). Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: Results from phase I and II studies. *J. Clin. Oncol.* *23*, 7660–7668.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M. (2013). A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*. *340*, 1100–1106.
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J.H., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. *351*, 728–733.
- Carlsson, S.R., Roth, J., Piller, F., and Fukuda, M. (1988). Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylactosaminoglycan. *J. Biol. Chem.* *263*, 18911–18919.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins De Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15803–15808.
- Chevillard, G., and Blank, V. (2011). NFE2L3 (NRF3): The Cinderella of the Cap'n'Collar transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3337–3348.
- Chowdhury, A.M.M.A., Katoh, H., Hatanaka, A., Iwanari, H., Nakamura, N., Hamakubo, T., Natsume, T., Waku, T., and Kobayashi, A. (2017). Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation. *Sci. Rep.* *7*, 12494.
- Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* *497*, 633–637.
- Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* *8*, 939–944.
- Davis, D.A., Dorsey, K., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Kaufman, J., Fales, H.M., and Levine, R.L. (1996). Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. *Biochemistry* *35*,

2482–2488.

Davis, D.A., Yusa, K., Gillim, L.A., Newcomb, F.M., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (1999). Conserved Cysteines of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Are Involved in Regulation of Polyprotein Processing and Viral Maturation of Immature Virions. *J. Virol.* *73*, 1156–1164.

Derjuga, A., Gourley, T.S., Holm, T.M., Heng, H.H., Shivdasani, R.A., Ahmed, R., Andrews, N.C., and Blank, V. (2004). Complexity of CNC transcription factors as revealed by gene targeting of the Nrf3 locus. *Mol Cell Biol* *24*, 3286–3294.

Dibble, C.C., and Manning, B.D. (2013). Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* *15*, 555–564.

Dirac-Svejstrup, A.B., Walker, J., Faull, P., Encheva, V., Akimov, V., Puglia, M., Perkins, D., Kümper, S., Hunjan, S.S., Blagoev, B., et al. (2020). DDI2 Is a Ubiquitin-Directed Endoprotease Responsible for Cleavage of Transcription Factor NRF1. *Mol. Cell* *79*, 332-341.e7.

Du, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol. Cell* *39*, 171–183.

Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S., and Clark, M.A. (2002). Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *62*, 5443–5450.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* *109*, 3812–3819.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* *281*, 1309–1312.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q., Kozłowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *J. Biol. Chem.* *273*, 14484–14494.

Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* *460*, 392–395.

Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Kuwabara, Y., Nakao, T., Nishiga, M., Usami, S., Izuhara, M., Sowa, N., Yahagi, N., et al. (2013). MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat. Commun.* *4*, 1–12.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume,

T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Hujber, Z., Petővári, G., Szoboszlai, N., Dankó, T., Nagy, N., Kriston, C., Krencz, I., Paku, S., Ozohanics, O., Drahos, L., et al. (2017). Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36, 1–12.

Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y. shin, Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., et al. (2013). Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Mol. Cell* 51, 618–631.

Itoh, K., Tong, K.I., and Yamamoto, M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1208–1213.

Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y., Tsukamoto, S., Matsui, T., Toyota, Y., Kodama, A., Ishihara, T., Mizushima, T., and Mizushima, N. (2016). An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol. Cell* 64, 835–849.

Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., and Haussler, a. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 12, 996–1006.

Kobayashi, A., Ito, E., Toki, T., Kogame, K., Takahashi, S., Igarashi, K., Hayashi, N., and Yamamoto, M. (1999). Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *J. Biol. Chem.* 274, 6443–6452.

Kobayashi, A., Kang, M., Watai, Y., Tong, K.I., and Shibata, T. (2006). Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. 26, 221–229.

Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 325–337.

de la Cruz López, K.G., Toledo Guzmán, M.E., Sánchez, E.O., and García Carrancá, A. (2019). mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front. Oncol.* 9, 1–22.

Law, B.K. (2005). Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 56, 47–60.

Lehrbach, N.J., Breen, P.C., and Ruvkun, G. (2019). Protein Sequence Editing of SKN-1A/Nrf1 by Peptide:N-Glycanase Controls Proteasome Gene Expression. *Cell* 177, 737-750.e15.

Lyssiotis, C.A., and Kimmelman, A.C. (2017). Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends Cell Biol.* 27, 863–875.

Matsubara, T., Tanaka, N., Sato, M., Kang, D.W., Krausz, K.W., Flanders, K.C., Ikeda, K., Luecke, H., Wakefield, L.M., and Gonzalez, F.J. (2012). TGF- β -SMAD3 signaling mediates hepatic bile acid and phospholipid metabolism following lithocholic acid-induced liver injury. *J. Lipid Res.* *53*, 2698–2707.

Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., Pearl, D., Siddiqui, N., Strack, S., McGuirk, S., et al. (2017). mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol. Cell* *67*, 922–935.

Morris, S.M. (2006). Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* *83*, 508S–512S.

Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* *294*, 1–12.

Mukherjee, S., and Mukherjee, U. (2009). A Comprehensive Review of Immunosuppression Used for Liver Transplantation. *J. Transplant.* *2009*, 1–20.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* *136*, 521–534.

Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., et al. (2011). mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* *146*, 408–420.

Petrović, V., Buzadžić, B., Korać, A., Vasiljević, A., Janković, A., and Korać, B. (2009). L-Arginine supplementation induces glutathione synthesis in interscapular brown adipose tissue through activation of glutamate-cysteine ligase expression: The role of nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* *182*, 204–212.

Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y., and Schulze, A. (2008). Article SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *8*, 224–236.

Ramanathan, A., and Schreiber, S.L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 22229–22232.

Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., et al. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* *64*, 5839–5849.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to

mTORC1. *Science*. *320*, 1496–1502.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.

Satoh, K., Yachida, S., Sugimoto, M., Oshima, M., Nakagawa, T., Akamoto, S., Tabata, S., Saitoh, K., Kato, K., Sato, S., et al. (2017). Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E7697–E7706.

Saucedo, L.J., Gao, X., Chiarelli, D.A., Li, L., Pan, D., and Edgar, B.A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat. Cell Biol.* *5*, 566–571.

Shen, K., and Sabatini, D.M. (2018). Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 9545–9550.

Shutt, T.E., and McBride, H.M. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Staying cool in difficult times : Mitochondrial dynamics , quality control and the stress response. *BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 417–424.

Sikstro, K., Zheng, L., Alain, T., Morita, M., Gravel, S., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., et al. (2013). mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *4*, 698–711.

Sivá, M., Svoboda, M., Veverka, V., Trempe, J.F., Hofmann, K., Kožíšek, M., Hexnerová, R., Sedlák, F., Belza, J., Brynda, J., et al. (2016). Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog. *Sci. Reports* *6*, 1–15.

Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T. (2003). Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* *2*, 488–494.

Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., et al. (2006). Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* *281*, 16768–16776.

Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H.P., and Tomita, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.* *81*, 6165–6174.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 15545–15550.
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., and Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* *47*, W556–W560.
- Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., and Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann. Oncol.* *16*, 525–537.
- Viitala, J., Carlsson, S.R., Siebert, P.D., and Fukuda, M. (1988). Molecular cloning of cDNAs encoding lamp A, a human lysosomal membrane glycoprotein with apparent $M(r) \approx 120,000$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 3743–3747.
- Waku, T., Nakajima, Y., Yokoyama, W., Nomura, N., Kako, K., Kobayashi, A., Shimizu, T., and Fukamizu, A. (2016). NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J. Cell Sci.* *129*, 2382–2393.
- Waku, T., Nakamura, N., Koji, M., Watanabe, H., Katoh, H., Tatsumi, C., Tamura, N., Hatanaka, A., Hirose, S., Katayama, H., et al. (2020). NRF3-POMP-20S Proteasome Assembly Axis Promotes Cancer Development via Ubiquitin-Independent Proteolysis of p53 and Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell. Biol.* *40*, e00597-19.
- Waku, T., Katayama, H., Hiraoka, M., Hatanaka, A., Nakamura, N., Tanaka, Y., Tamura, N., Watanabe, A., and 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.
- Waku, T., Hagiwara, T., Tamura, N., Atsumi, Y., Urano, Y., Suzuki, M., Iwami, T., Sato, K., Yamamoto, M., Noguchi, N., et al. (2021). NRF3 upregulates gene expression in SREBP2-dependent mevalonate pathway with cholesterol uptake and lipogenesis inhibition. *iScience* *24*, 103180.
- Waku, T., Iwami, T., Masuda, H., Hirose, S., Aketa, I., and Kobayashi, A. (2022). Nrf3 Functions Reversely as a Tumorigenic to an Antitumorigenic Transcription Factor in Obese Mice. *Tohoku J. Exp. Med.*
- Wang, C., Saji, M., Justiniano, S.E., Yusof, A.M., Zhang, X., Yu, L., Fernández, S., Wakely, P., la Perle, K., Nakanishi, H., et al. (2017). RCAN1-4 is a thyroid cancer growth and metastasis suppressor. *JCI Insight* *2*, 1–15.
- Wang, D., Wan, X., Du, X., Zhong, Z., Peng, J., Xiong, Q., Chai, J., and Jiang, S. (2021). Insights into the interaction of lysosomal amino acid transporters slc38a9 and slc36a1 involved in mtorc1 signaling in c2c12 cells. *Biomolecules* *11*, 1–17.
- Wang, H., Zhan, M., Yang, R., Shi, Y., Liu, Q., and Wang, J. (2018). Elevated expression of

NFE2L3 predicts the poor prognosis of pancreatic cancer patients. *Cell Cycle* 17, 2164–2174.

Wang, S., Tsun, Z.-Y., Wolfson, R.L., Shen, K., Wyant, G.A., Plovanich, M.E., Yuan, E.D., Jones, T.D., Chantranupong, L., Comb, W., et al. (2015). Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. 347, 188–194.

Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.

Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Saxton, R.A., Shen, K., Scaria, S.M., Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2016). Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. 351, 43–48.

Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Marc Rhoads, J., Carey Satterfield, M., Smith, S.B., Spencer, T.E., and Yin, Y. (2009). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37, 153.

Wyant, G.A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R.L., Chen, W.W., Freinkman, E., Danai, L. V., Vander Heiden, M.G., and Sabatini, D.M. (2017). mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell* 171, 642–654.

Xia, J., Psychogios, N., Young, N., and Wishart, D.S. (2009). MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.* 37, W652–W660.

Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System : a Thiol-Based Maintaining Redox Homeostasis. *Physiological Rev.* 98, 1169–1203.

Yao, K., Yin, Y.L., Chu, W., Liu, Z., Deng, D., Li, T., Huang, R., Zhang, J., Tan, B., Wang, W., et al. (2008). Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J. Nutr.* 138, 867–872.

Youle, R.J., and Van Der Blik, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 337, 1062–1065.

Zhang, Y., Nicholatos, J., Dreier, J.R., Ricoult, S.J.H., Widenmaier, S.B., Hotamisligil, G.S., Kwiatkowski, D.J., and Manning B.D. (2014). Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature* 513, 440–443.

Zhang, C., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y., Wu, Y., Li, T.Y., Liang, Y., Lu, Z., et al. (2014). The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1 , Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metab.* 20, 526–540.

8. 図表

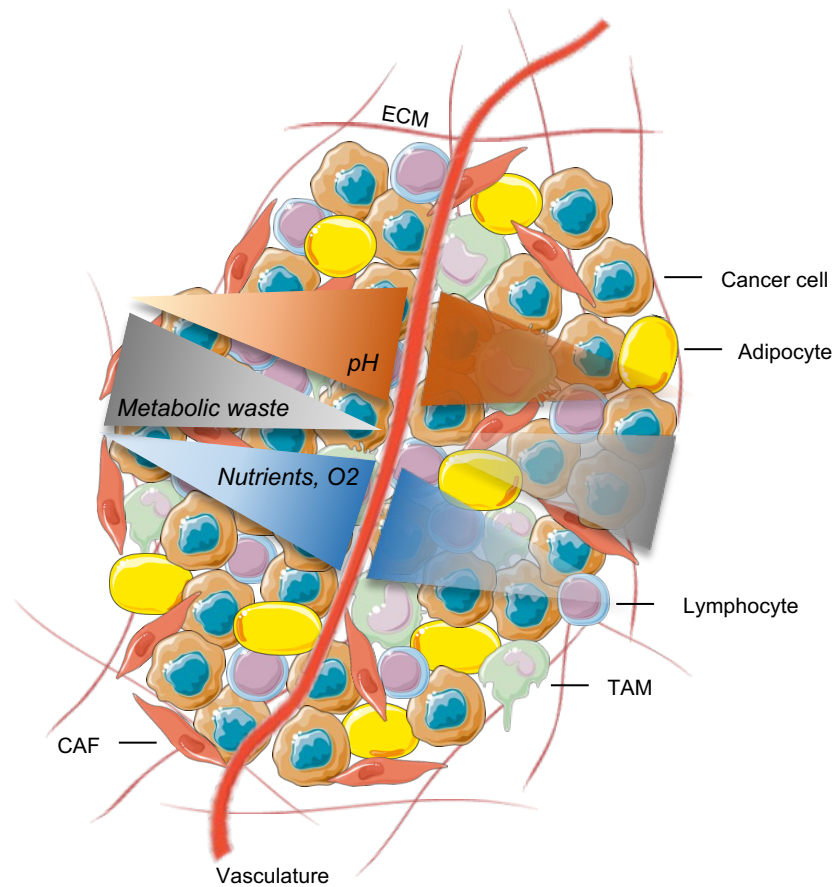


図1. 腫瘍微小環境のモデル図

血管から遠ざかるほど酸素や栄養素の濃度、pHが低下する。図は Servier Medical Art を使用して作成し、Creative Commons Attribution 3.0 Unported License のもとで許諾されている。ECM：extra cellular matrix、TAM：tumor associated macrophage、CAF：cancer associated fibroblast

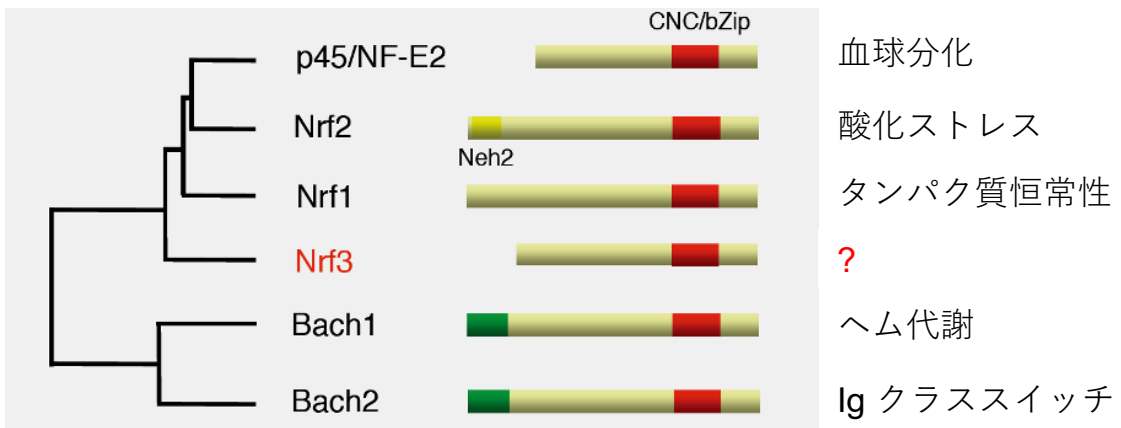


図2. CNC ファミリー転写因子の系統図

CNC ファミリー転写因子は転写調節領域として塩基製ロイシンジッパー(bZip)ドメインを持ち、small MAF 群転写因子と共役する。右側に各転写因子の機能を示した。

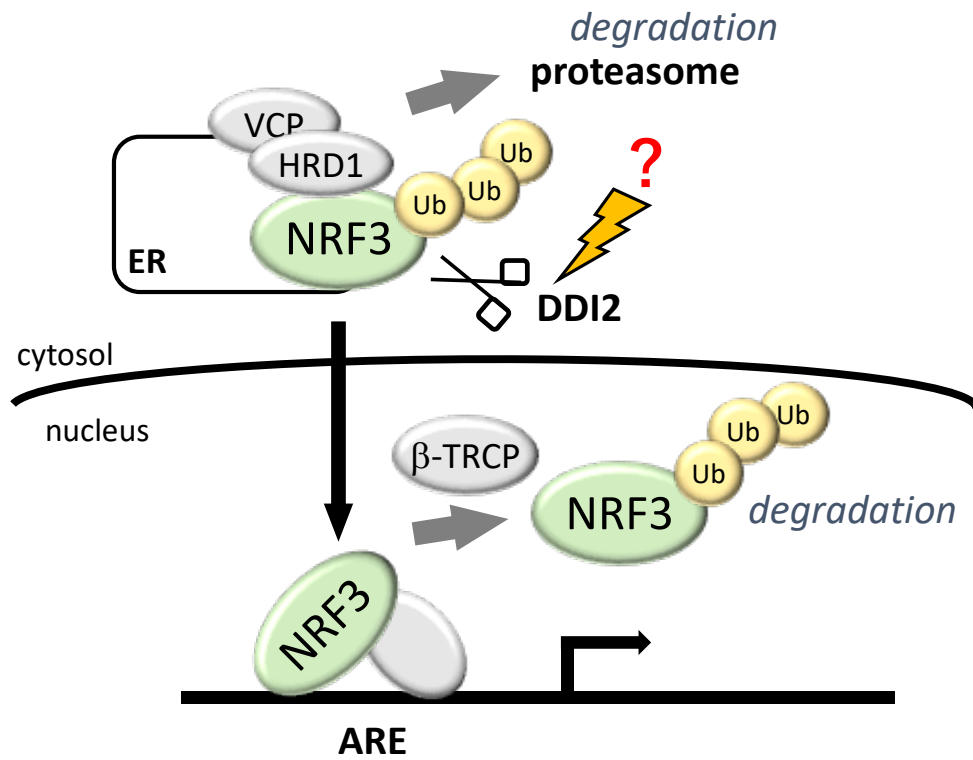


図3. NRF3 活性制御のモデル図

NRF3は小胞体膜に膜貫通ドメインを持ち、繋ぎ留められている。プロテアソーム阻害などの刺激を受けると DDI2 によって切断され核移行し、標的遺伝子の転写を活性化する(Chowdhury et al., 2017b)。

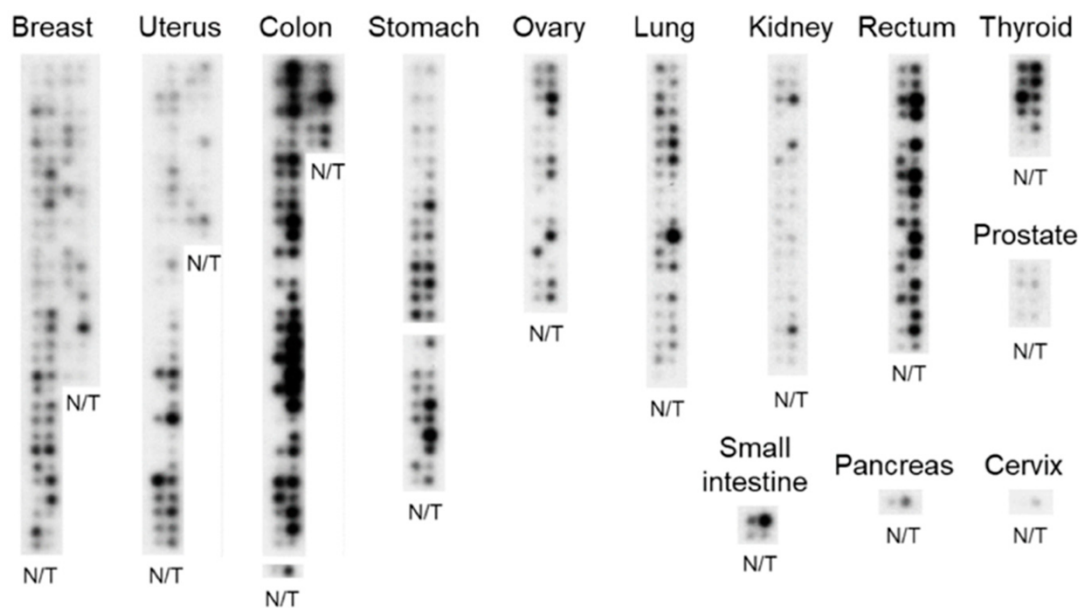


図4. がん組織におけるNRF3発現量

Human Multiple Tissue Expressionアレイを用いたNRF3のRNAドットブロット解析。76の異なるヒト組織から抽出したmRNAを、ユビキチンmRNA量で補正している(Aono et al., 2019)。

N：がん周辺の正常組織、T：がん組織

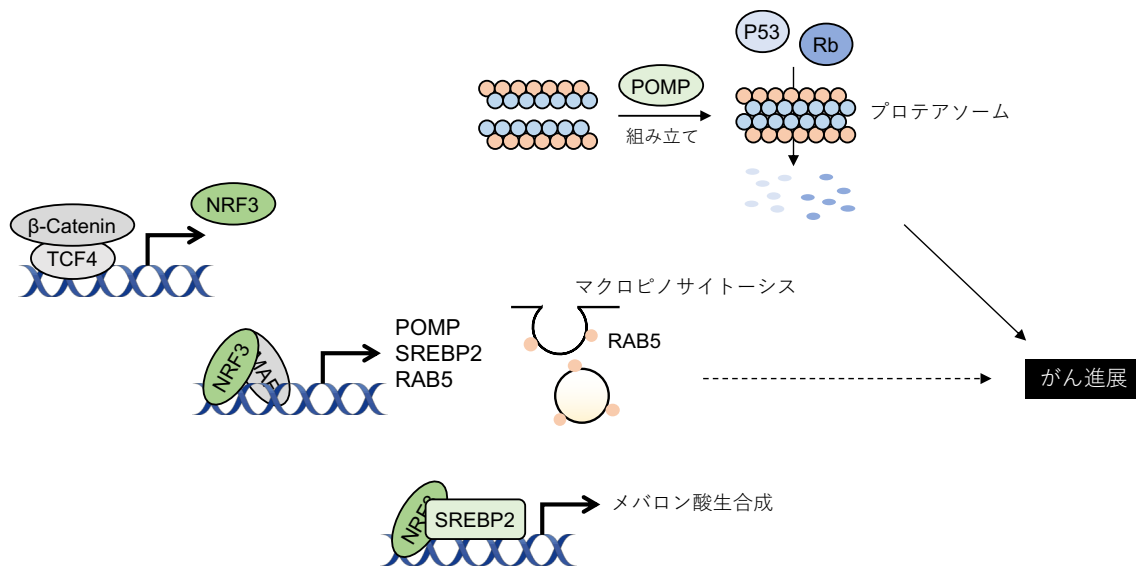


図5. NRF3 研究の背景

APC 変異に起因する WNT/ β -catenin 経路の活性化によって発現誘導された NRF3 は POMP、SREBP2、RAB5 などの遺伝子を転写活性化する。POMP はプロテアソームの組み立てを触媒することで、がん抑制タンパク質である P53 やレチノブラストーマ (Rb) の分解を促進する。SREBP2 はコレステロール生合成経路をリプログラミングしてメバロン酸の生合成を促進し、Rab5 はマクロピノサイトーシスによる細胞外取り込みを誘導する。

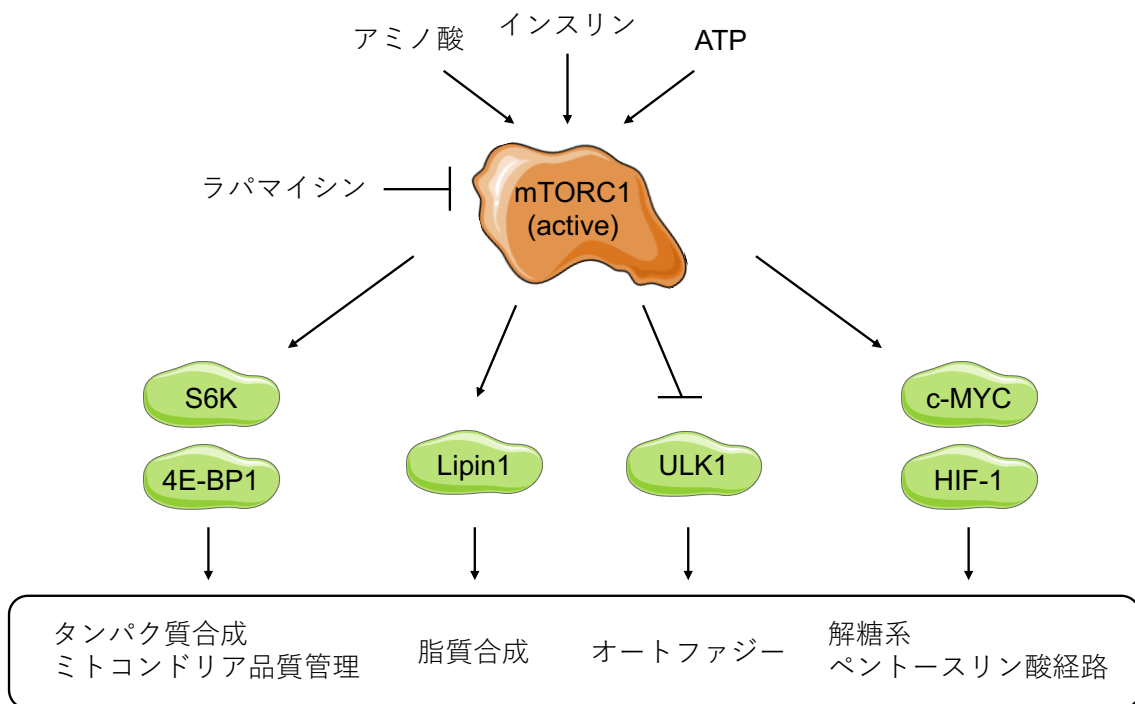


図6. mTORC1の生理的機能

mTORC1はアミノ酸やインスリン、ATPなどによって活性化し、タンパク質のリン酸化を介して様々な生理的経路を制御する。例えば、タンパク質合成や脂質合成などの同化反応を促進し、オートファジーといった異化反応を抑制する。

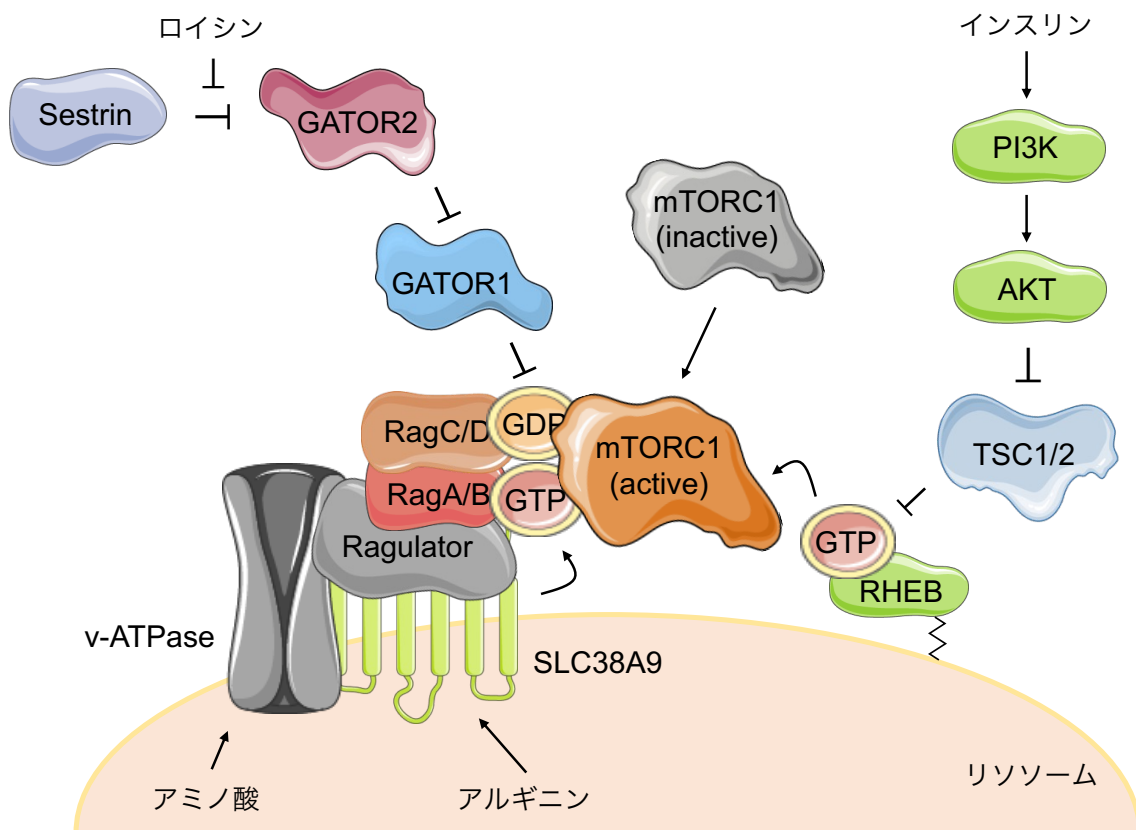


図7. mTORC1の活性化経路

mTORC1の活性化経路はアミノ酸によるRagタンパク質を介した局在制御と、インスリンによるRHEBタンパク質を介した活性付与に大別される。

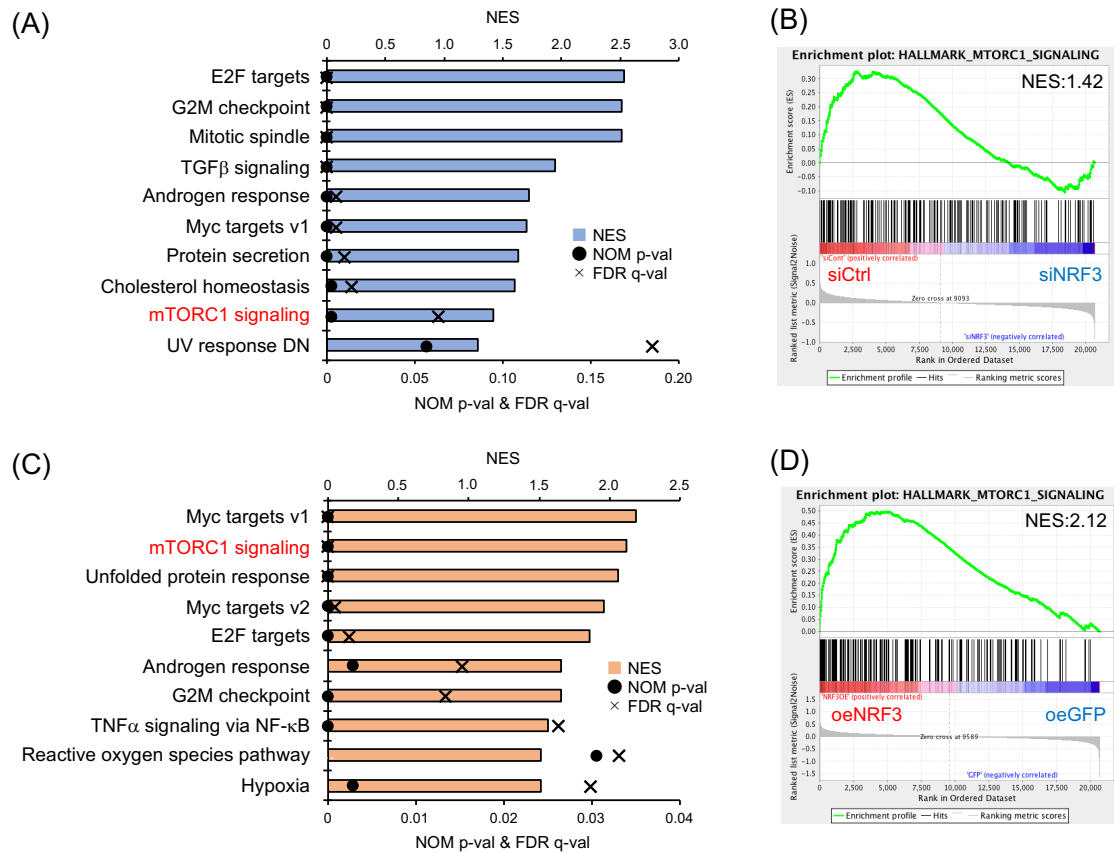


図 8 . HCT116-siNRF3/siCtrl細胞およびH1299-oeNRF3/oeGFP細胞のGSEA解析 (A-D) 以前に報告しているDNAマイクロアレイデータ(Waku et al., 2021)を、GSEAソフトウェアv.3.0 (Subramanian et al., 2005)を用いて解析した。(A)と(C)では、遺伝子セットのランクをnormalized enrichment score (NES)の高い順に並べた。(A)と(C)は、"mTORC1 signaling"のエンリッチメントプロットを示している。(NOM p-val: nominal p value, FDR q-val: false discovery rate q value)

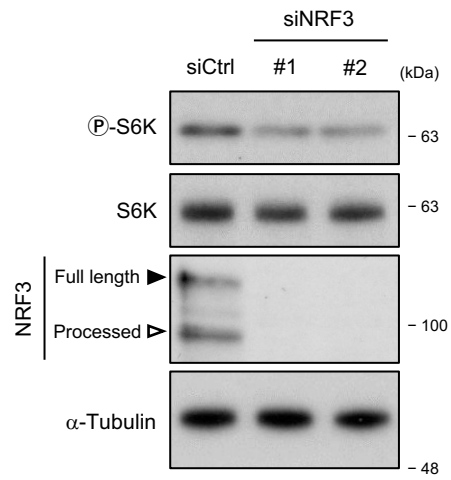


図9. mTORC1 活性に対する NRF3 ノックダウンの影響
HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。全長 NRF3 タンパク質は黒矢印で、切断された NRF3 タンパク質は白矢印で示した。

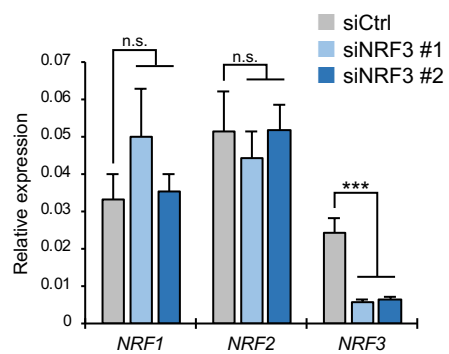


図 10. siNRF3 の NRF1 と NRF2 mRNA に対する影響

HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。 (***: $p < 0.005$, n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

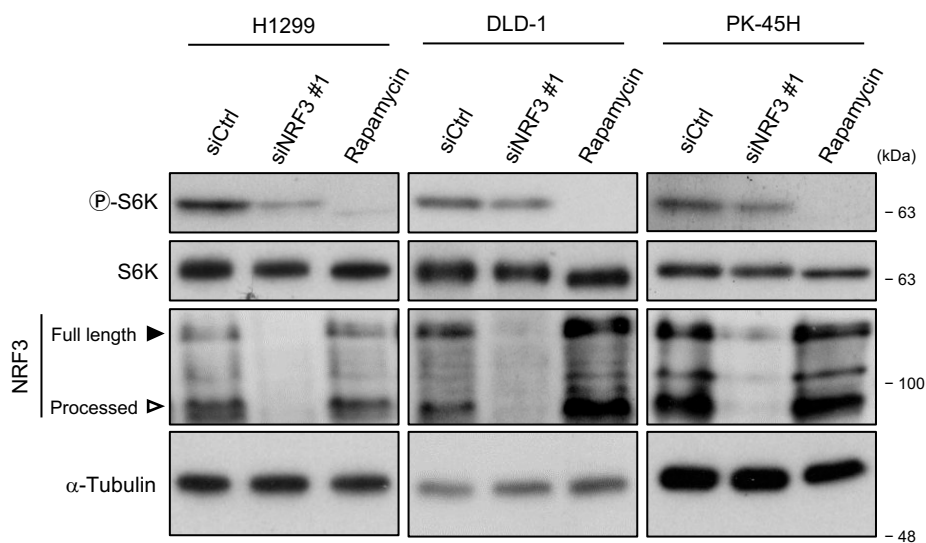


図1 1. H1299、DLD-1、PK-45H細胞における mTORC1 活性に対する NRF3 ノックダウンの影響

H1299、DLD-1、PK-45H細胞に siRNA をトランスフェクションし、1日間培養した。コントロールとして、各細胞に siCtrl をトランスフェクションし、10 μM ラパマイシンで1日培養した。NRF3 タンパク質の全長を黒矢印で、切断された NRF3 タンパク質を白矢印で示した。

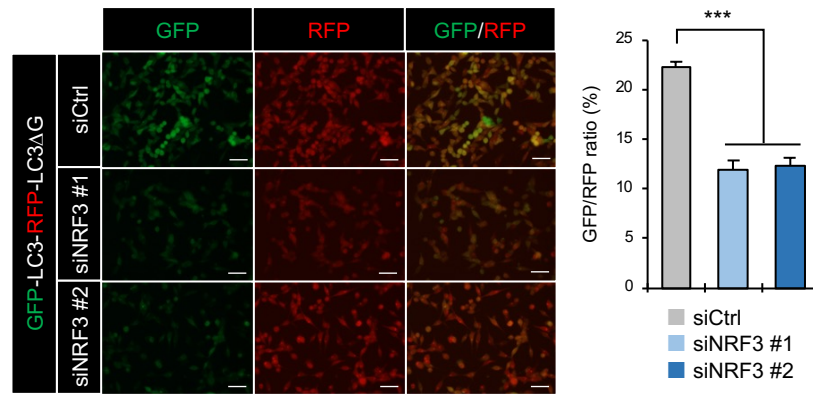


図1 2. NRF3 ノックダウンのオートファジーへの影響

GFP-LC3-RFP-LC3ΔG を安定的に発現している HCT116 細胞に、siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。左図は、代表的な画像を示している。右のグラフは、GFP および RFP の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し、GFP/RFP 比を算出した。Scale bar: 10 μm (***: p<0.005, ANOVA followed by Tukey's test, n=3)

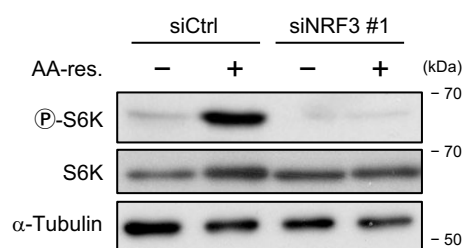


図 1 3. アミノ酸刺激による mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンの影響
HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。さらにアミノ酸欠乏培地で 5 時間培養した後、15 分間アミノ酸で刺激した。

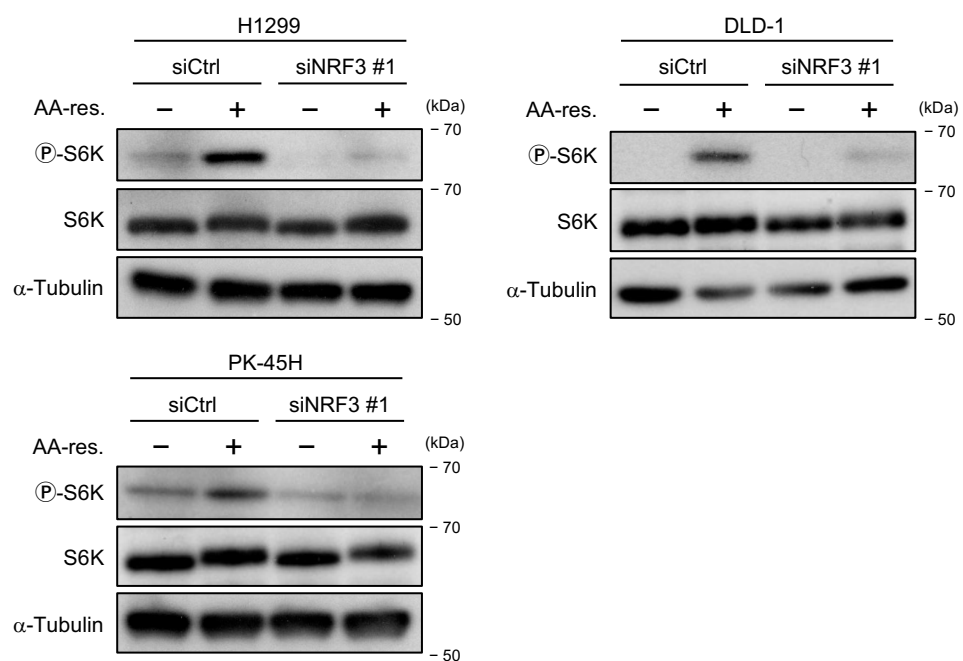


図 1 4. H1299、DLD-1、PK-45H 細胞におけるアミノ酸依存的な mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンの影響

H1299、DLD-1、PK-45H 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。その後、H1299 と PK-45H 細胞はアミノ酸欠乏培地で 16 時間培養し、その後アミノ酸で 15 分間再刺激した。DLD-1 細胞は、アミノ酸欠乏培地で 16 時間培養し、その後アミノ酸で 1 時間再刺激した。

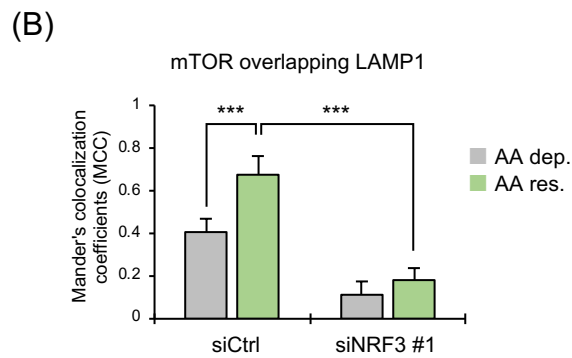
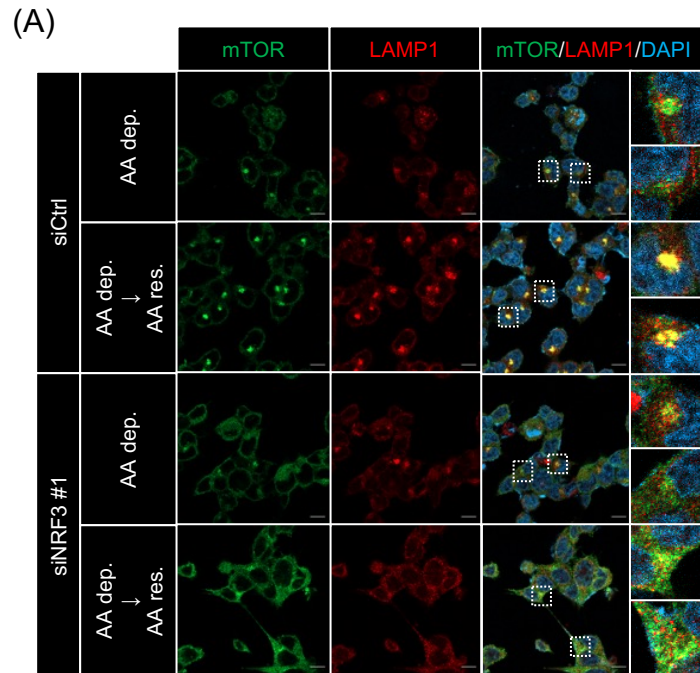


図15. アミノ酸刺激によるリソソーム上への mTOR リクルートに対する NRF3 ノックダウンの影響

(A) HCT116 細胞を図6と同様に培養・刺激した。白点線囲んだ部分を右側に拡大している。Scale bar: 10 μ m。

(B) (A)における LAMP1 と mTOR の共局在定量。LAMP1 に重なる mTOR の割合を Mander's colocalization coefficients (MCC)で算出した。(***: $p < 0.005$, ANOVA followed by Tukey's test, $n > 100$)

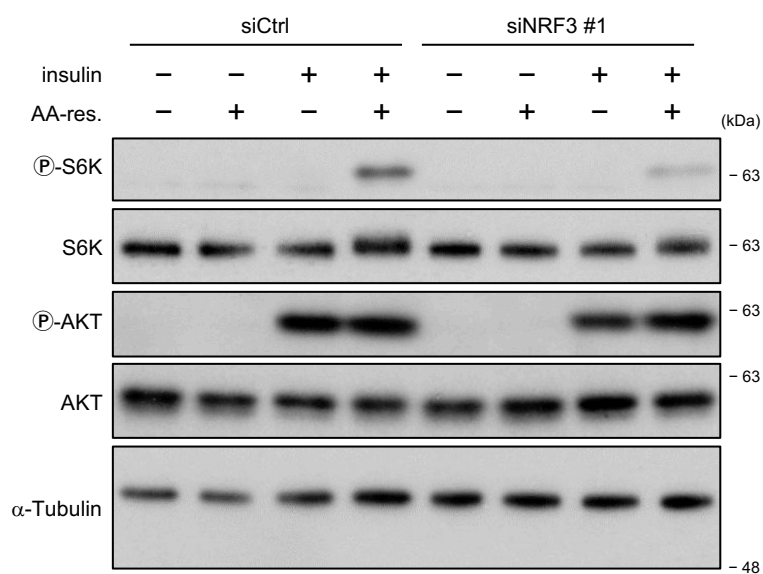


図16. アミノ酸およびインスリン刺激による mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンの影響

HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、アミノ酸および FBS を含まない培地で 5 時間培養し、アミノ酸または 400 nM インスリンで 30 分間再刺激した。

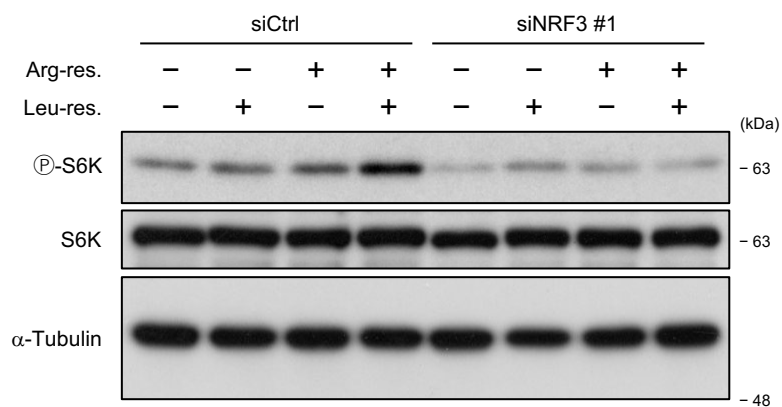


図17. アルギニンおよびロイシンによる mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンの影響

HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、アルギニンおよびロイシン欠乏培地で 5 時間培養し、アルギニンおよびロイシンで 15 分間再刺激を行った。

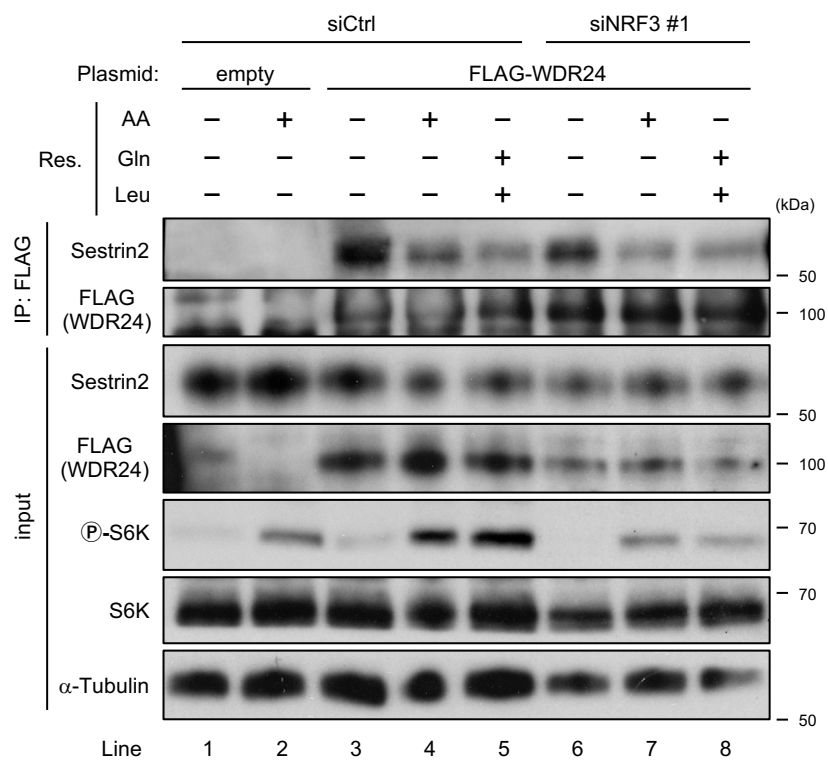
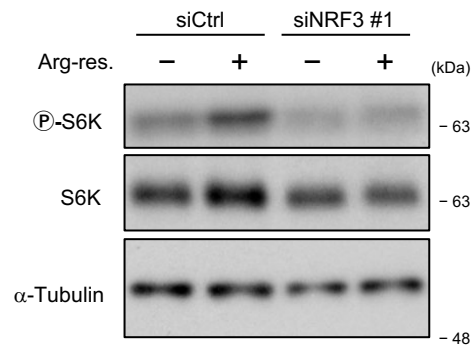


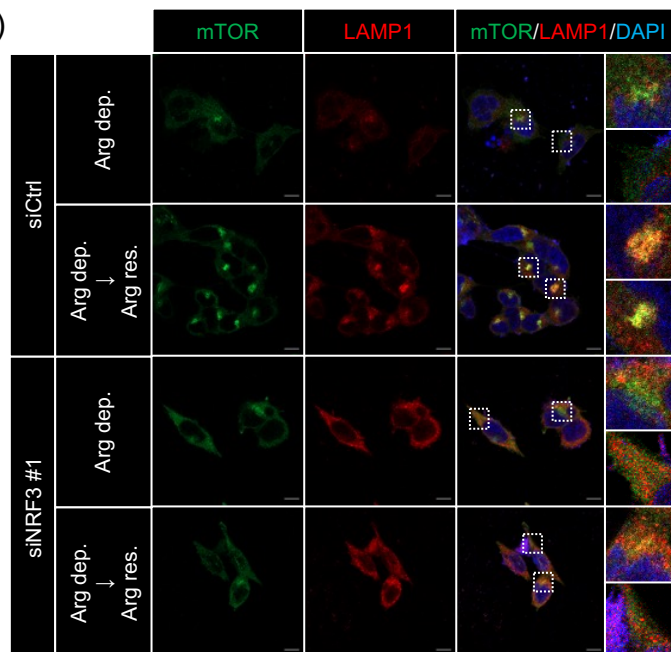
図18. ロイシンによる Sestrin2-GATOR2 相互作用に対する NRF3 ノックダウンの影響

HCT116 細胞に siRNA および、pcDNA3.1 (empty) または pRK5 FLAG-WDR24 (FLAG-WDR24) プラスミドをトランスフェクションし 2 日間培養した。さらに、アミノ酸欠乏培地で 5 時間培養した後、指定したアミノ酸で 15 分間再刺激した。抗 FLAG 抗体で免疫沈降 (IP:FLAG) したタンパク質抽出液を、指定の抗体を用いてウエスタンブロットで解析した。

(A)



(B)



(C)

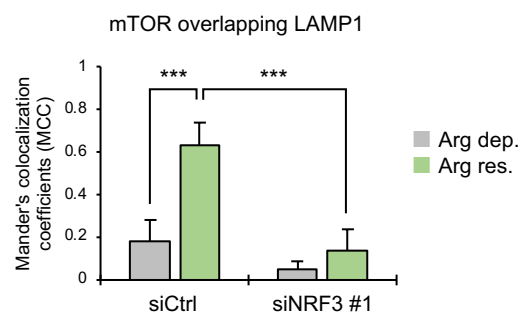


図19. アルギニン刺激による mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンの影響

(A) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。さらにアルギニン欠乏培地で 5 時間培養した後、15 分間アルギニンで刺激した。

(B) HCT116 細胞を(A)と同様に培養・刺激した。白点線囲んだ部分を右側に拡大している。Scale bar: 10 μm 。

(C) (B)における LAMP1 と mTOR の共局在定量。LAMP1 に重なる mTOR の割合を Mander's colocalization coefficients (MCC)で算出した。(***: $p < 0.005$, ANOVA followed by Tukey's test, $n > 100$)

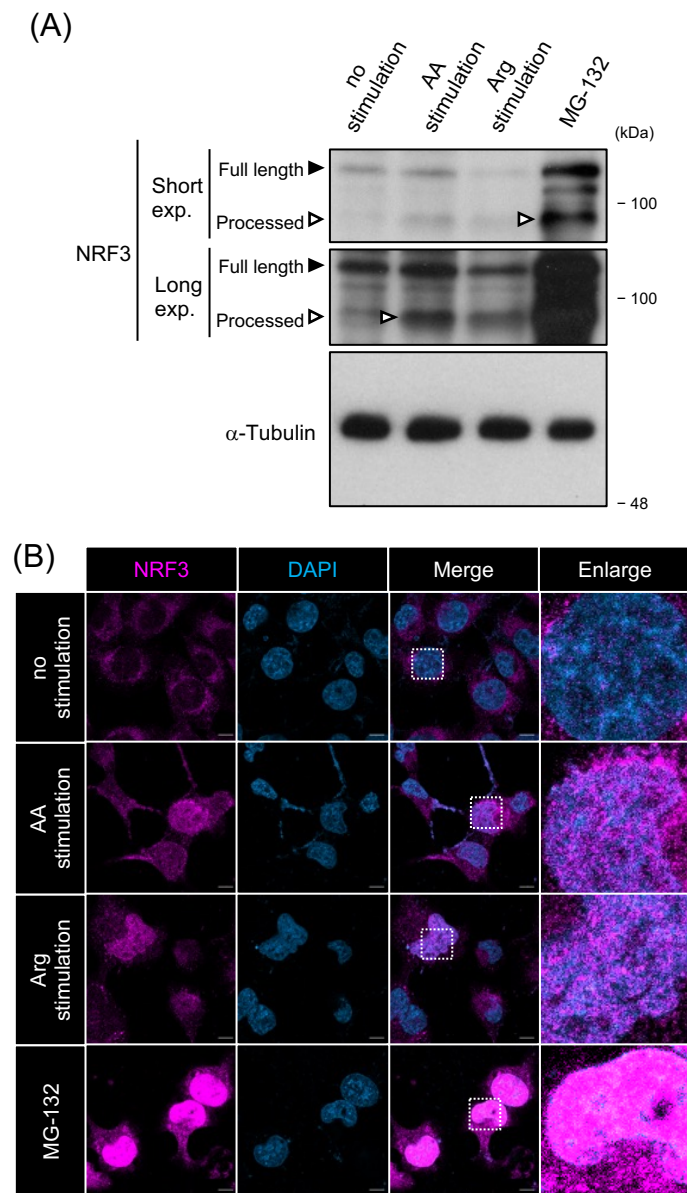


図 2 0 . NRF3 タンパク質切断(A)・核移行(B)に対するアミノ酸またはアルギニン刺激の影響

(A & B) H1299-oeNRF3 細胞を、アミノ酸またはアルギニン欠乏培地で 24 時間培養した後、15 分間アミノ酸またはアルギニンで再刺激した。なお、ポジティブコントロールとして、細胞を 1 μ M MG-132 で 24 時間刺激した。NRF3 タンパク質の全長を黒矢印で、切断された NRF3 タンパク質を白矢印で示した。

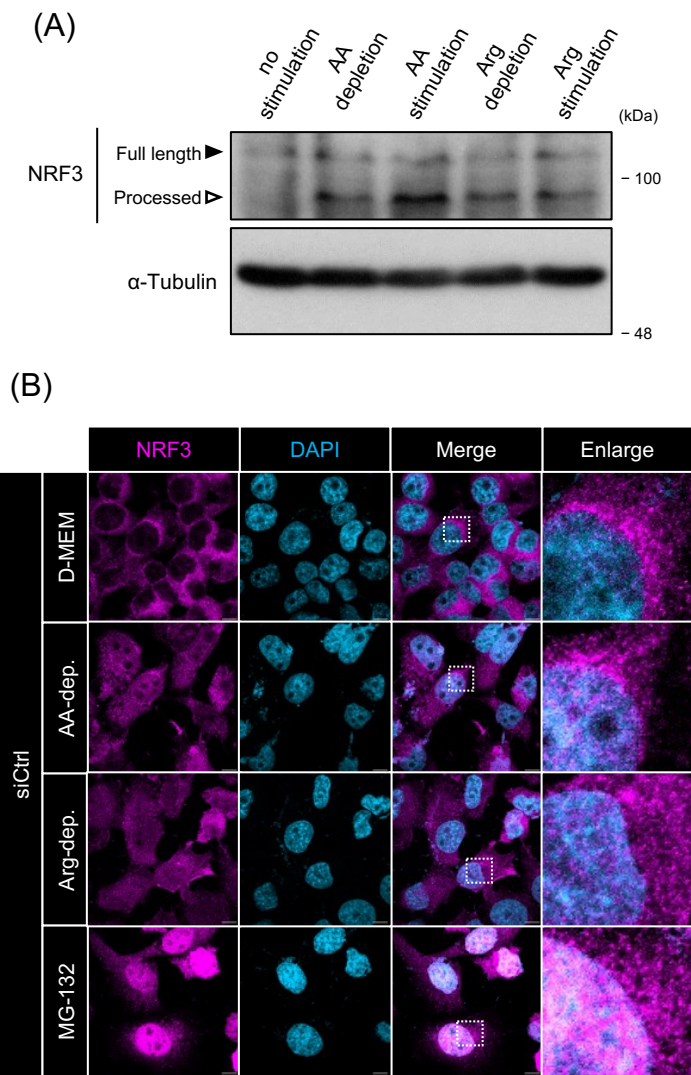


図 2 1. NRF3 タンパク質切断(A)・核移行(B)に対するアミノ酸またはアルギニン欠乏の影響

(A & B) H1299-oeNRF3 細胞を、アミノ酸またはアルギニン欠乏培地で 24 時間培養した。なお、ポジティブコントロールとして、細胞を 1 μ M MG-132 で 24 時間刺激した。NRF3 タンパク質の全長を黒矢印で、切断された NRF3 タンパク質を白矢印で示した。

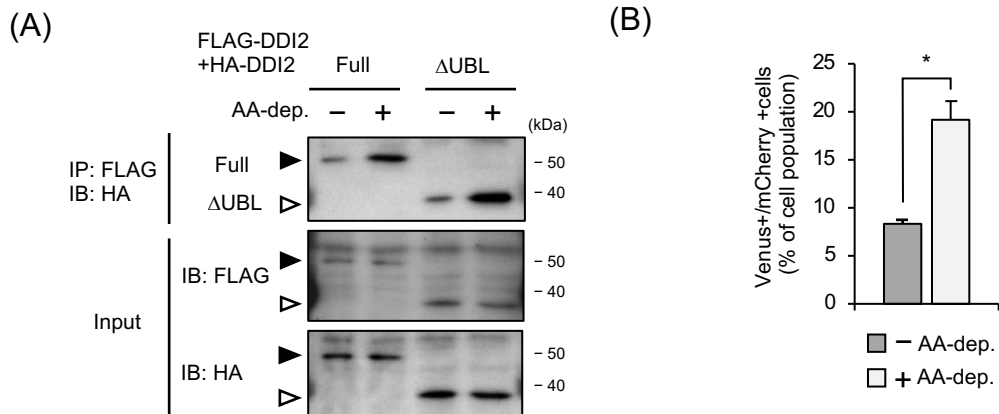


図 2 2. DDI2 タンパク質の二量体化に対するアミノ酸刺激の影響

(A) HCT116 細胞に FLAG-/HA-DDI2 (Full、白矢印) または FLAG-/HA-DDI2 Δ UBL (Δ UBL、黒矢印) を発現するプラスミドをトランスフェクションした。その後、アミノ酸欠乏培地で 3 時間培養し、FLAG 抗体で免疫沈降した (IP:FLAG) タンパク質抽出液を指定の抗体を用いてウエスタンブロットで解析した。

(B) HCT116 細胞に N 末端/C 末端 Venus-DDI2 Δ UBL プラスミドをトランスフェクションし、(A)と同様に刺激した。フローサイトメトリーで mCherry 陽性細胞における Venus 蛍光強度の中央値を測定した。(*: p<0.05, Welch's t-test, n=3)

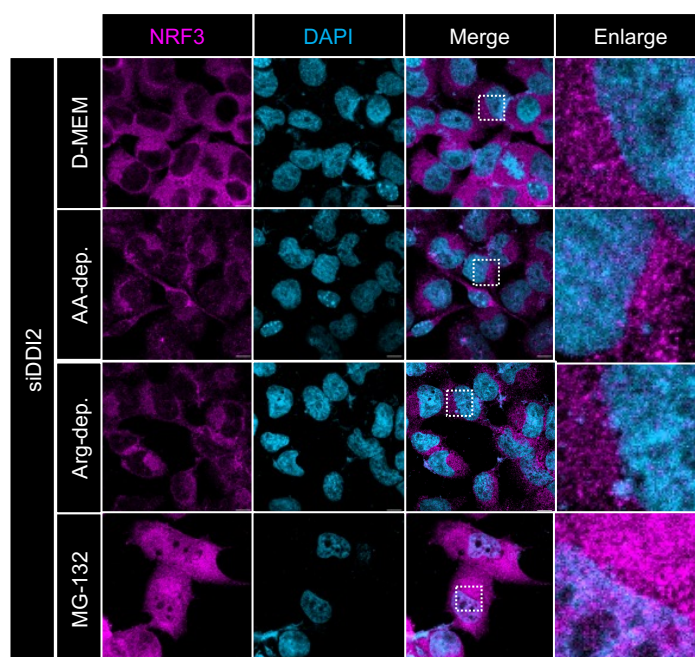


図 2 3. アミノ酸またはアルギニン欠乏による NRF3 の核移行に対する DDI2 ノックダウンの効果

H1299-oeNRF3 細胞に siDDI2 をトランスフェクションし、図 14 と同様に刺激した。

scale bar: 10 μ m。

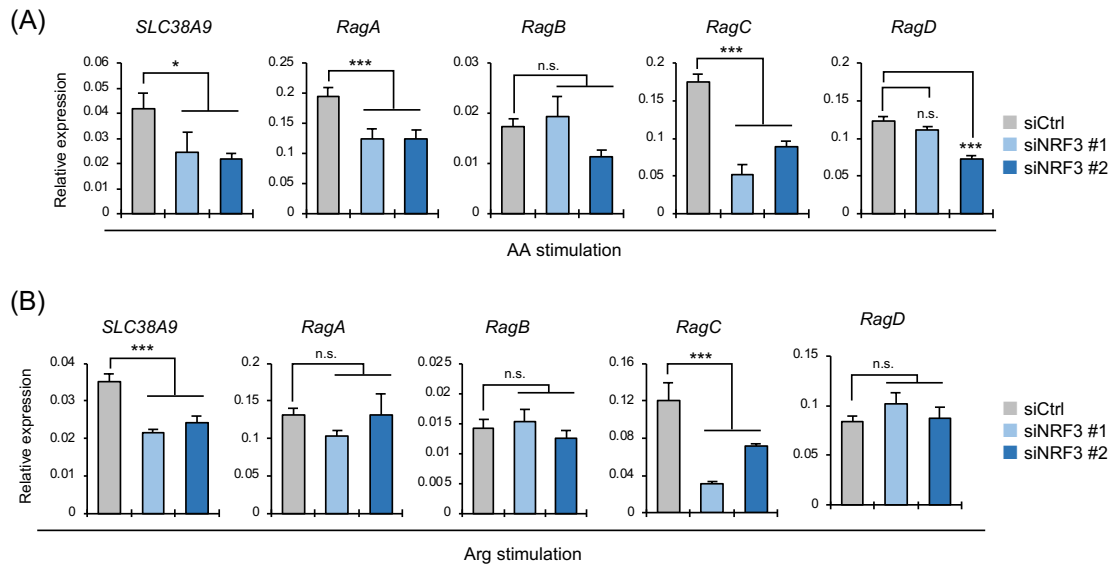


図 24. アミノ酸(A)またはアルギニン(B)刺激下での Ragulator 関連遺伝子の発現に対する NRF3 ノックダウンの影響

(A & B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、アミノ酸(A)またはアルギニン(B)欠乏培地で 5 時間培養し、それぞれアミノ酸(A)またはアルギニン(B)で 15 分間再刺激した。(***: $p < 0.005$, *: $p < 0.01$, n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

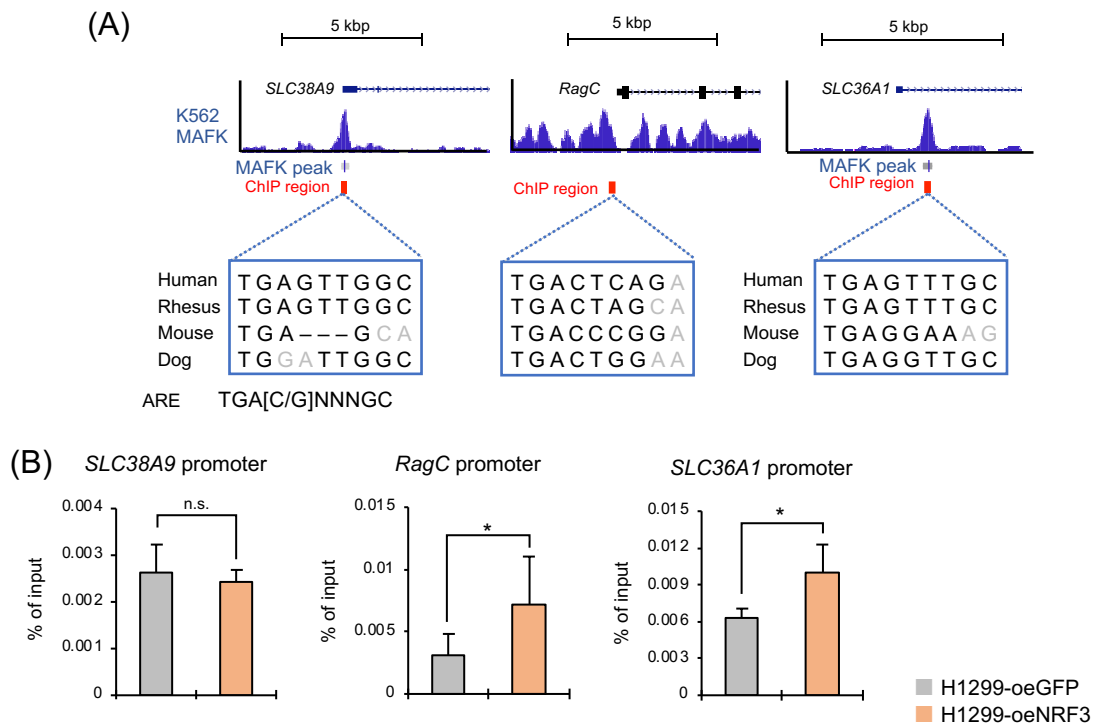


図 2 5. SLC38A9、RagC、SLC36A1 のプロモーターへの NRF3 の結合

(A) ヒトゲノム (GRCh37/hg19) における SLC38A9、RagC、SLC36A1 のプロモーター領域。MAFK の ChIP-seq シグナルを青いヒストグラムで示し、ChIP-qPCR を行った領域を赤い四角で示した。また、UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002) を用いて、候補 ARE の配列を示した。

(B) H1299-oeNRF3/oeGFP 細胞に 1 μ M MG-132 で 16 時間刺激した。ChIP のターゲット領域は(A)で示した。(*: $p < 0.05$, n.s.: not significant, Welch's t-test, $n=3$)

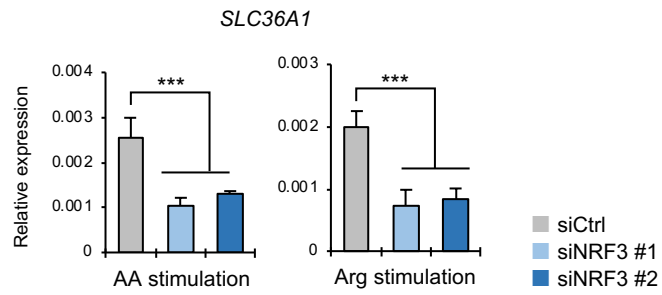


図 2 6. アミノ酸またはアルギニン刺激下での SLC36A1 遺伝子の発現に対する NRF3 ノックダウンの影響
 HCT116 細胞を図 17 と同様に培養・刺激した。 (***: $p < 0.005$, ANOVA followed by Tukey's test, $n = 3$)

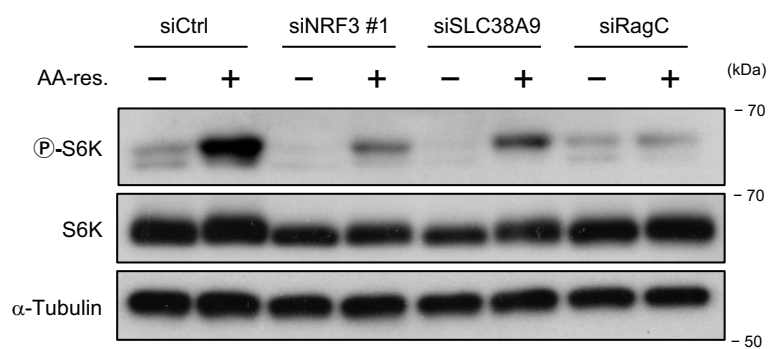


図27. アミノ酸刺激による mTORC1 活性化に対する SLC38A9 および RagC ノックダウンの影響

HCT116 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、図 17(A)と同様に刺激した。

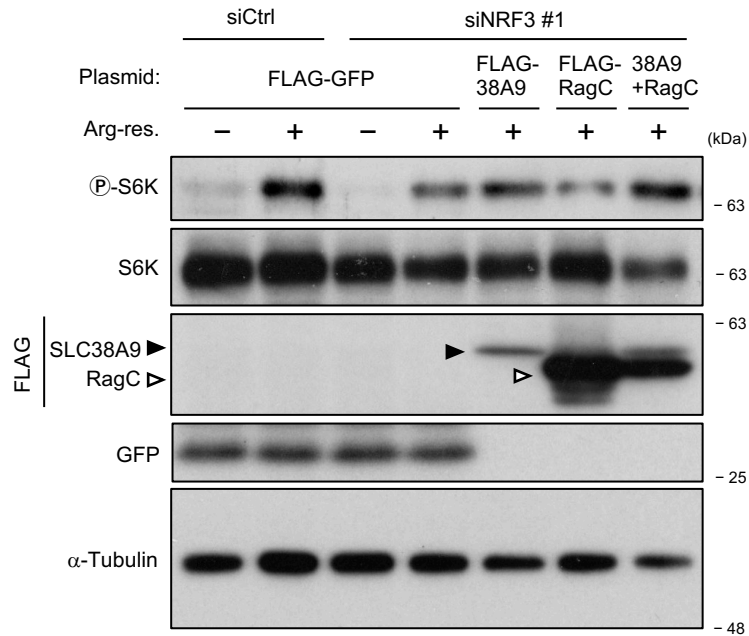


図 2 8. HCT116-siNRF3 細胞におけるアルギニン刺激による mTORC1 活性化に対する SLC38A9 と RagC 回復の効果

HCT116 細胞に p3×FLAG-CMV10-GFP (FLAG-GFP)、pRK5 FLAG-SLC38A9.1 (FLAG-38A9、黒矢印)、pRK5 FLAG-RagC (FLAG-RagC、白矢印)をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。さらに、アルギニン欠乏培地で 5 時間培養した後、アルギニンで 15 分間最刺激した。

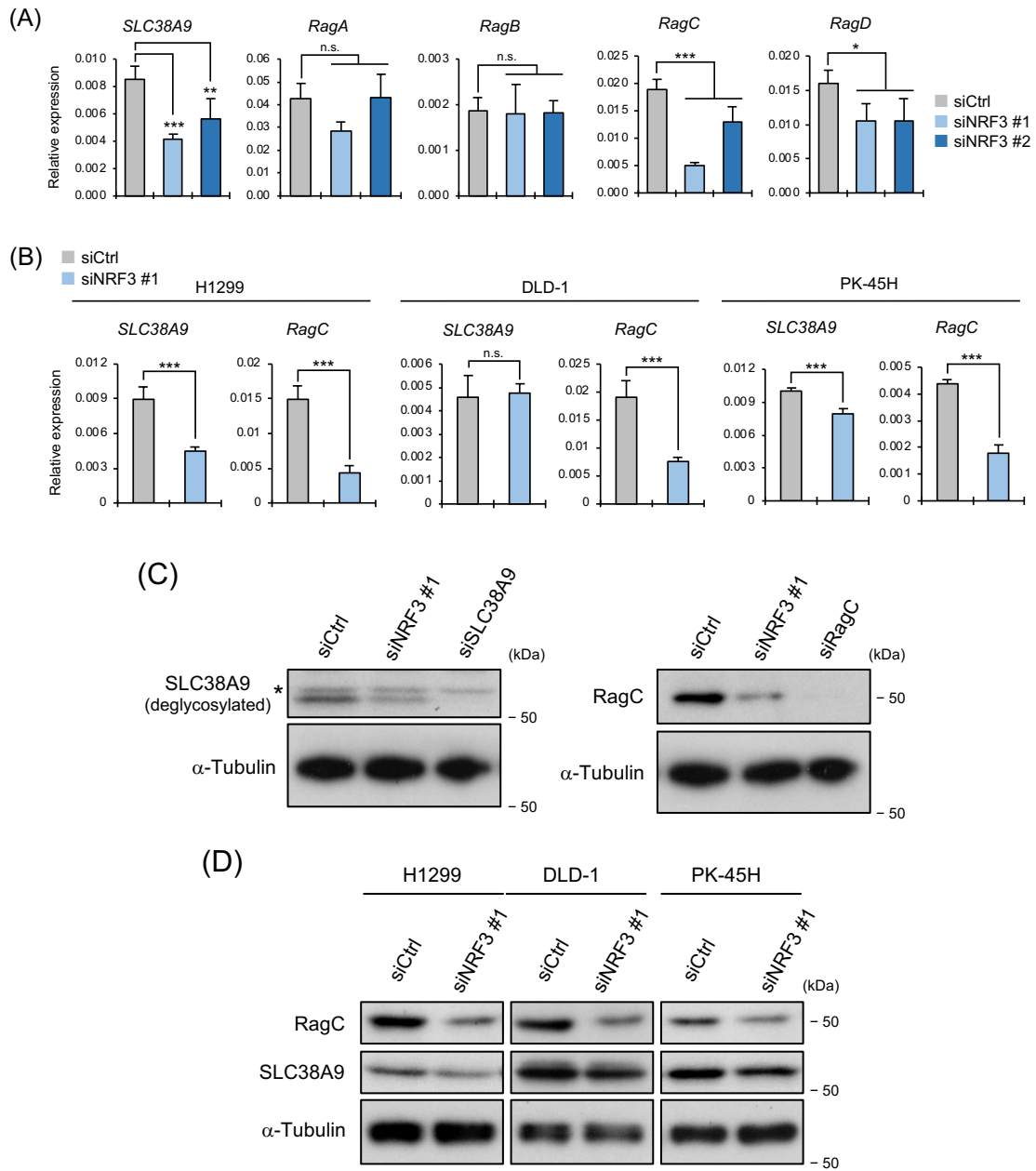


図 2 9. 通常培養下における SLC38A9 および RagC の mRNA およびタンパク質発現への NRF3 ノックダウンの影響

(A & B) HCT116 (A)、H1299、DLD-1、PK-45H (B)細胞における SLC38A9 および RagC の mRNA 発現への NRF3 ノックダウンの影響。siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。(A) (***: $p < 0.005$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)、(B) (***: $p < 0.005$, n.s.: not significant, Welch's t-test, $n=3$) (C & D) HCT116 (C)、H1299、DLD-1、PK-45H (D)細胞における SLC38A9 および RagC のタンパク質発現への NRF3 ノックダウンの影響。siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。非特異的なバンドは*で示した。

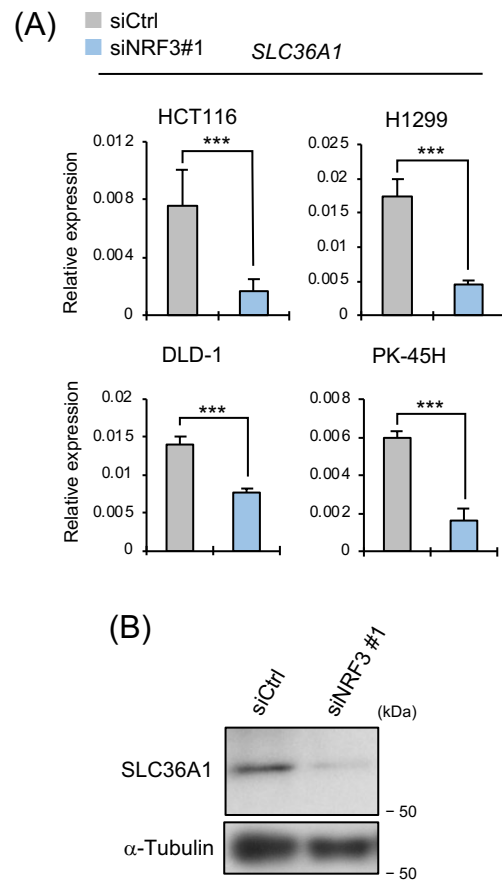


図 3 0. 通常培養下における SLC36A1 の mRNA (A)およびタンパク質(B)発現への NRF3 ノックダウンの影響

(A & B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。(***: $p < 0.005$, Welch's t-test, $n = 3$)

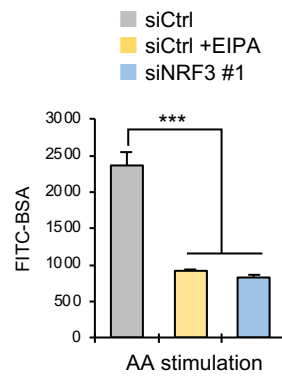


図3 1. アミノ酸刺激下でのマクロピノサイトーシス誘導に対する NRF3 ノックダウンの影響

HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 μ M EIPA を添加して 1 日間培養した。その後、アミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、アミノ酸および 1 mg/ml FITC-BSA で 15 分間再刺激を行った。FITC の蛍光強度の中央値(MFI)をフローサイトメトリーで測定した。(***: $p < 0.005$, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

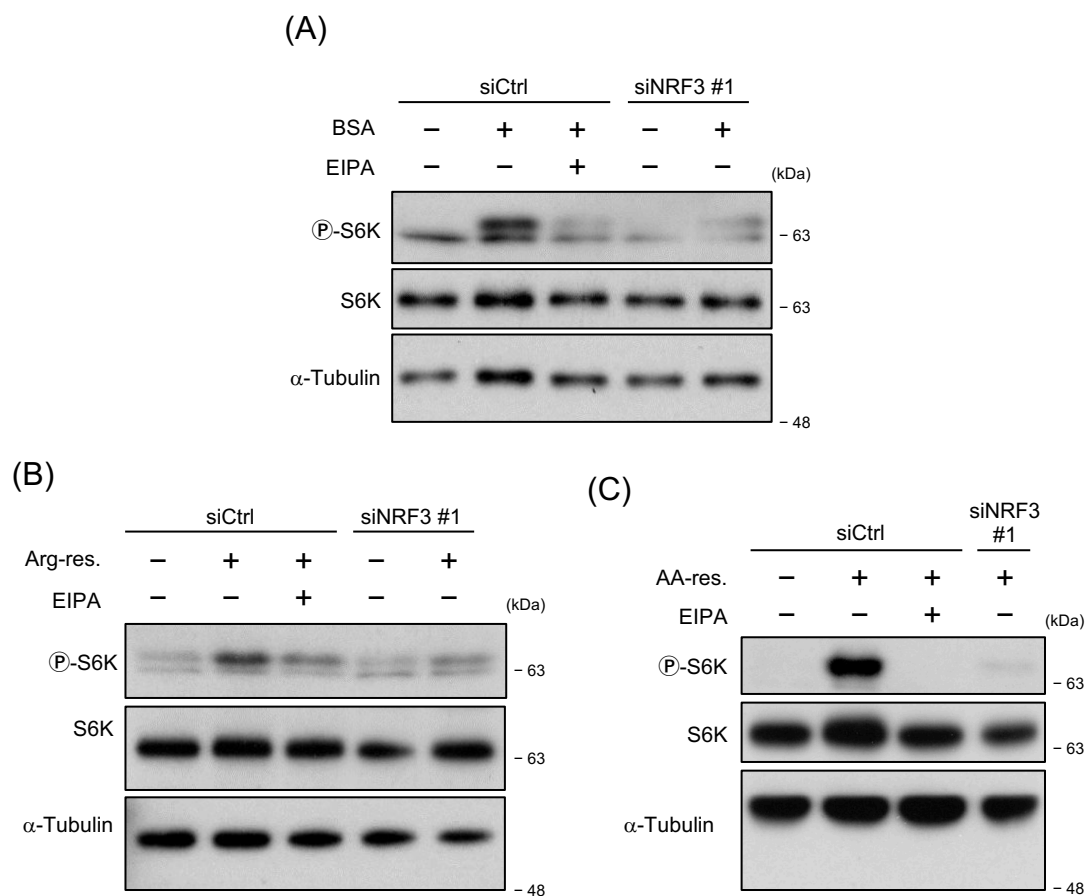


図3 2. BSA (A)、アルギニン(B)、アミノ酸刺激(C)による mTORC1 活性化に対する NRF3 ノックダウンおよびマクロピノサイトーシス阻害の影響

(A) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、FBS およびアミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、5% BSA を含む培地で 4 時間再刺激した。コントロールとして、HCT116-siCtrl 細胞に 100 μ M EIPA を添加し同様の操作を行った。

(B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、FBS およびアミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、アミノ酸で 4 時間再刺激した。コントロールとして、HCT116-siCtrl 細胞に 100 μ M EIPA を添加し同様の操作を行った。

(C) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、FBS およびアルギニン欠乏培地で 5 時間培養し、アルギニンで 4 時間再刺激した。コントロールとして、HCT116-siCtrl 細胞に 100 μ M EIPA を添加し同様の操作を行った。

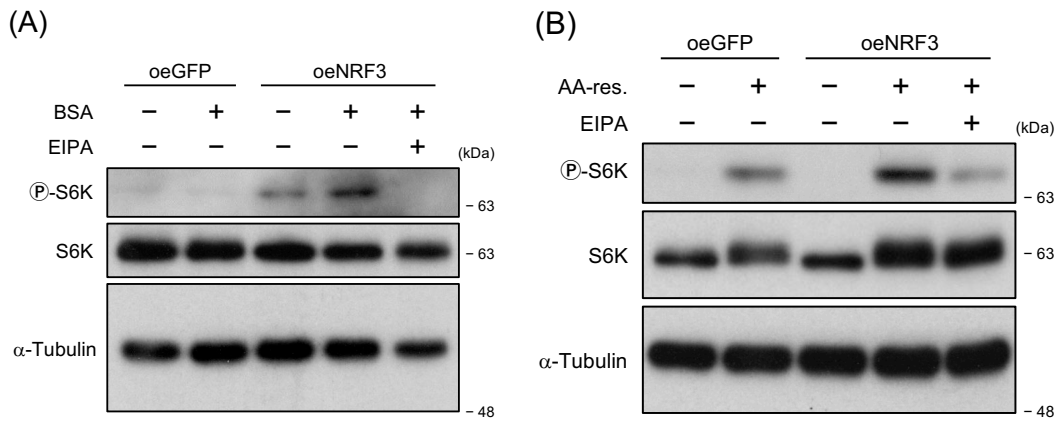


図 3 3 . BSA (A)、アミノ酸刺激(B)による mTORC1 活性化に対する NRF3 過剰発現とマクロピノサイトーシス阻害による影響

(A & B) H1299-oeNRF3/oeGFP 細胞を FBS およびアミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、5% BSA (A)またはアミノ酸(B)で 4 時間刺激した。なお、コントロールとして H1299-oeNRF3 細胞に 100 μ M EIPA を添加し同様の操作を行った。

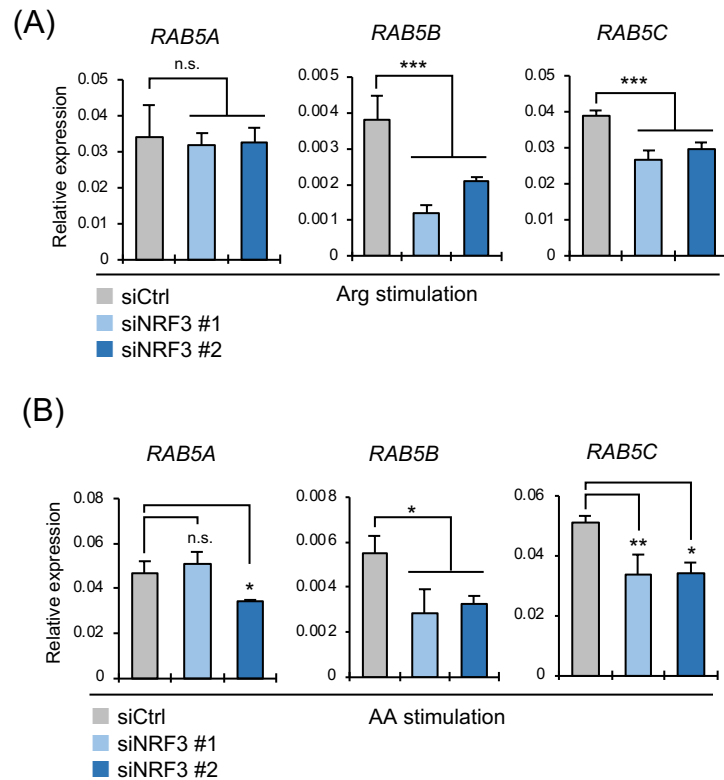


図3 4. アルギニン(A)またはアミノ酸(B)刺激下での RAB5 遺伝子の発現に対する NRF3 ノックダウンの影響

(A & B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、アルギニン(A)またはアミノ酸(B)欠乏培地で 5 時間培養し、それぞれアルギニン(A)またはアミノ酸(B)で 15 分間再刺激した。(***: $p < 0.005$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

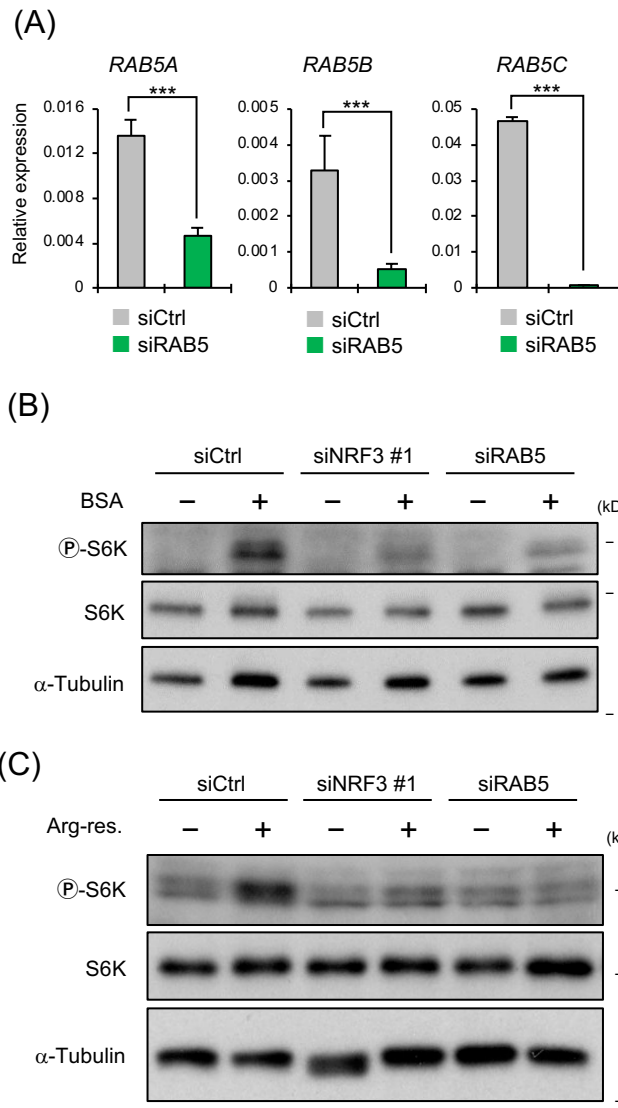


図 3 5 . BSA (B)、アルギニン(C)刺激による mTORC1 活性化に対する RAB5 ノックダウンの影響

(A) siRAB5 のノックダウン効率。HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。なお、siRAB5 は siRAB5A、siRAB5B、siRAB5C の混合である。(***: $p < 0.005$, Welch's t-test, $n=3$)

(B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、図 24(A)と同様に培養・刺激した。

(C) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、図 24(B)と同様に培養・刺激した。

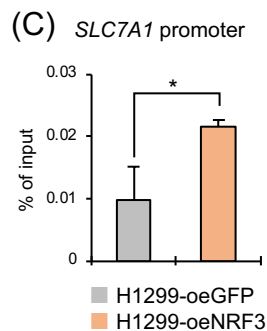
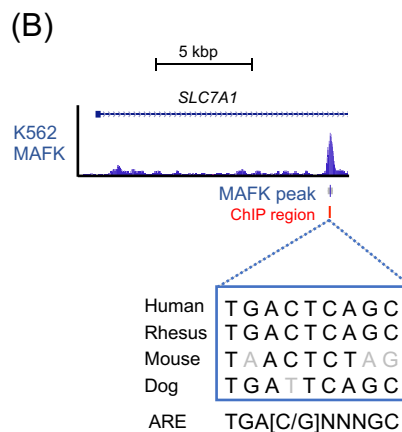
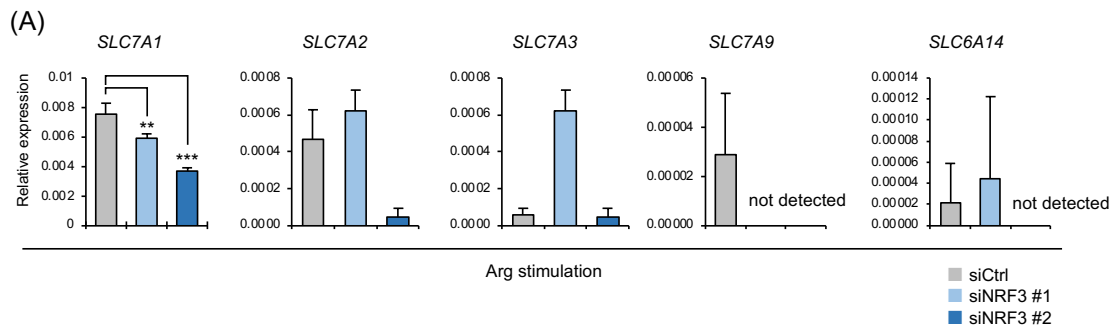


図36. アルギニン刺激下でのアルギニントランスポーター遺伝子の発現に対する NRF3 ノックダウンの影響

(A) HCT116細胞を図17(B)と同様に培養・刺激した。(***: $p < 0.005$, **: $p < 0.01$, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

(B) ヒトゲノム (GRCh37/hg19) における SLC7A1 のプロモーター領域。MAFK の ChIP-seq シグナルを青いヒストグラムで示し、ChIP-qPCR を行った領域を赤い四角で示した。また、UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002) を用いて、候補 ARE の配列を示した。

(C) H1299-oeNRF3/oeGFP細胞に $1\mu\text{M}$ MG-132 で16時間刺激した。ChIPのターゲット領域は(B)で示した。

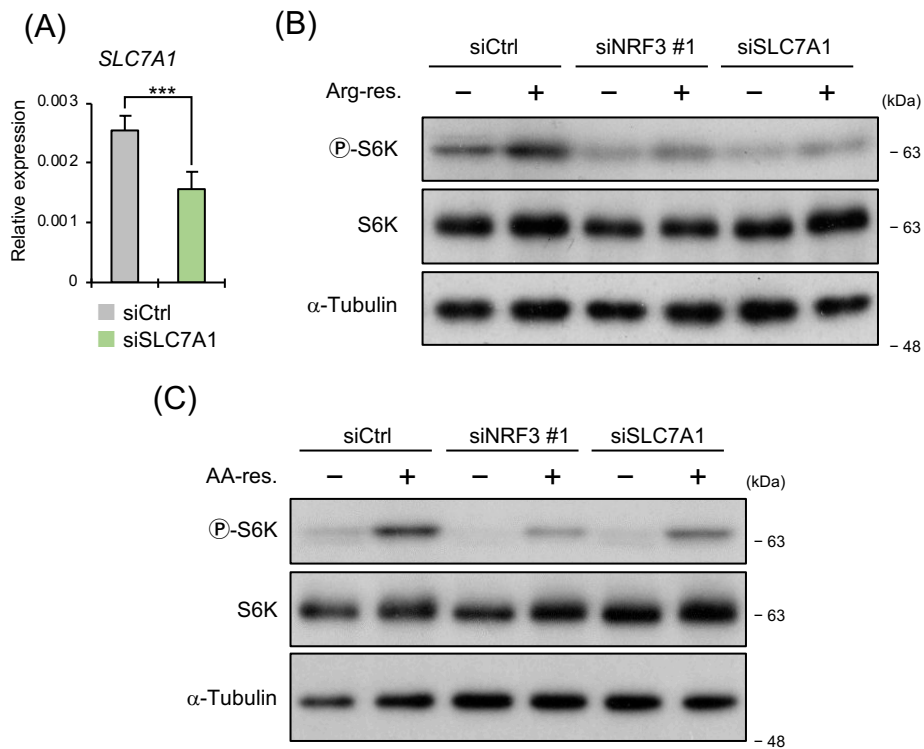


図37. アルギニン(B)、アミノ酸(C)刺激による mTORC1 活性化に対する SLC7A1 ノックダウンの影響

(A) siSLC7A1 のノックダウン効率。HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。(***: $p < 0.005$, Welch's t-test, $n = 3$)

(B & C) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、アルギニン(B)またはアミノ酸(C)欠乏培地で 5 時間培養し、それぞれアルギニン(B)またはアミノ酸(C)で 15 分間再刺激した。

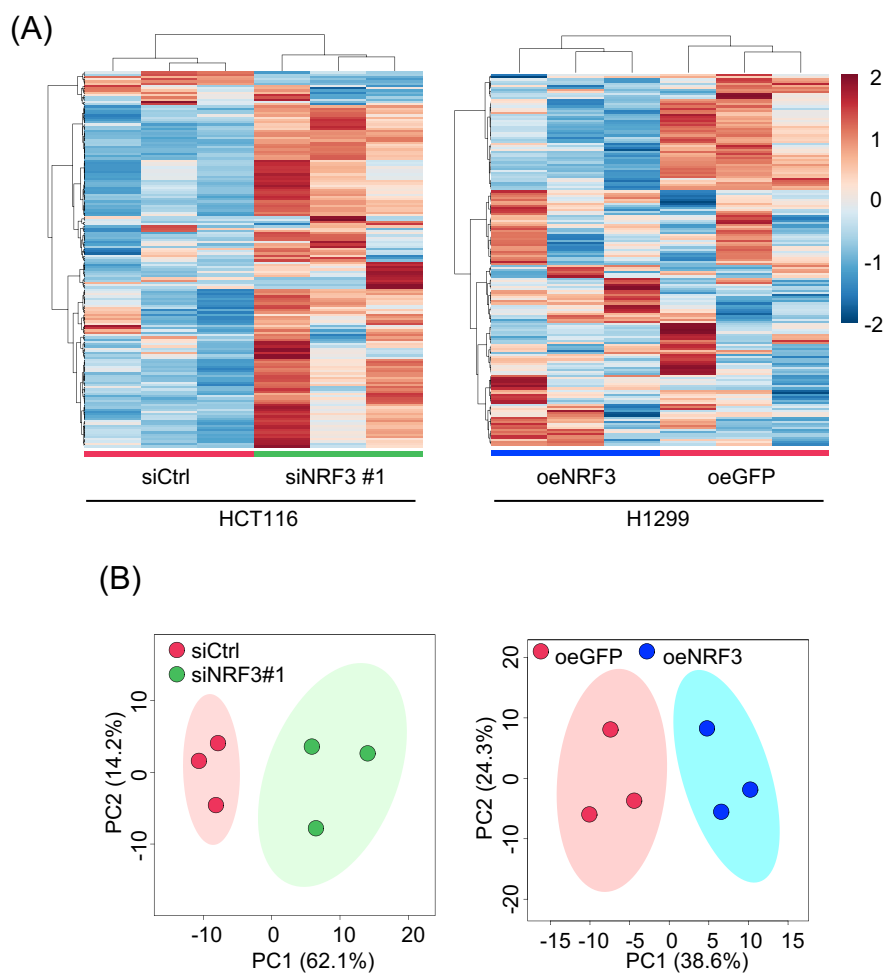


図38. メタボロームデータのクラスター解析(A)およびPCA分析(B)
(A & B) HCT116-siNRF3/siCtrl 細胞(左)、H1299-oeNRF3/oeGFP 細胞(右)を用いた。
 HCT116 はアミノ酸刺激を行った。

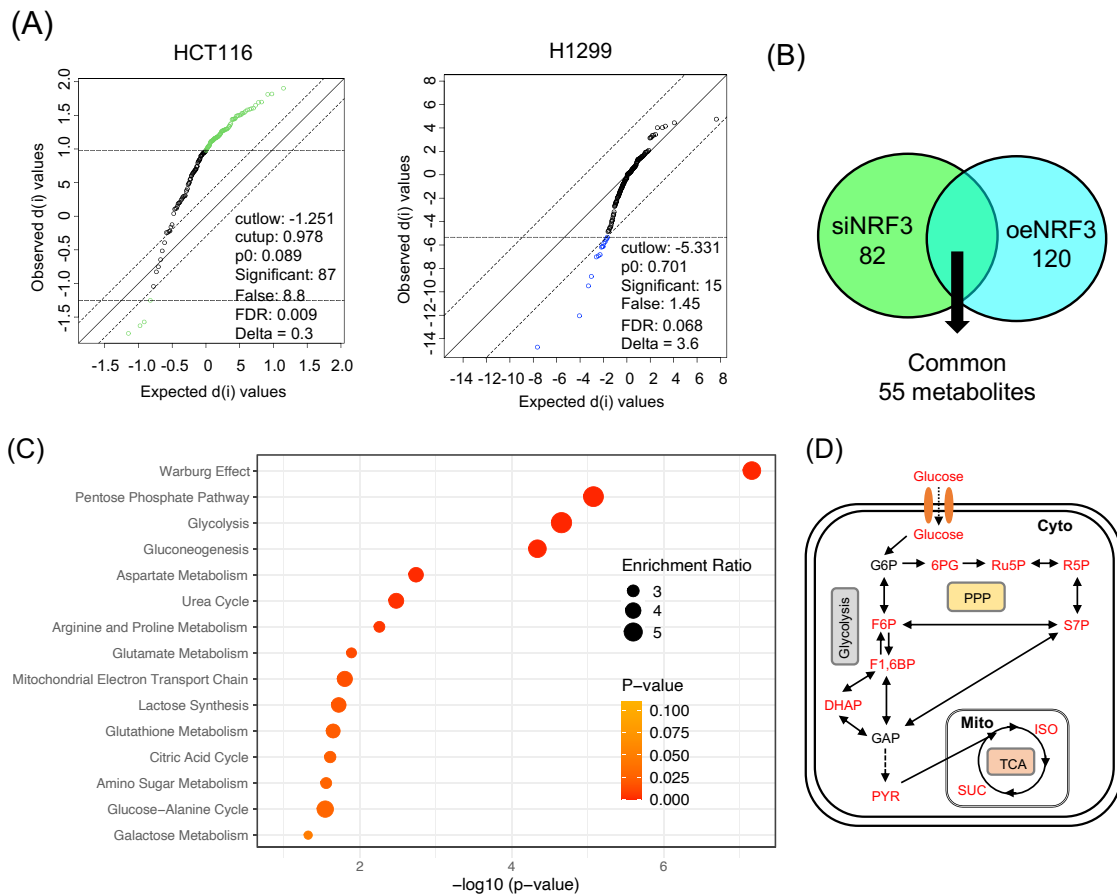


図39 メタボロームデータのエンリッチメント解析

(A) 図30における有意差分析。変動のあった代謝物を同定した。

(B) HCT116-siNRF3 および H1299-oeNRF3 で共通して変動のあった代謝物の抽出。55の代謝物が同定された。

(C) (B)で同定された代謝物のエンリッチメント解析。

(D) NRF3 が影響を及ぼす代謝物と代謝経路を示す模式図。(C)で示した「ワールブルグ効果」に含まれる代謝物を赤色で表示した。

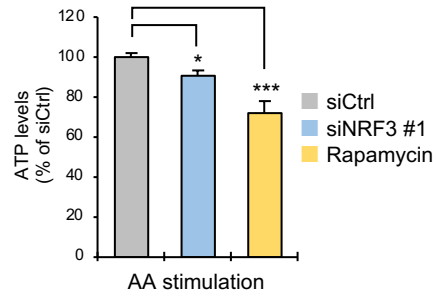


図40. アミノ酸刺激下での細胞内 ATP レベルに対する NRF3 ノックダウンまたはラパマイシンの影響

HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、アミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、さらにアミノ酸で 15 分間再刺激した。なお、コントロールとして HCT116-siCtrl 細胞に 10 μ M ラパマイシンを加えてアミノ酸刺激した。(***: $p < 0.005$, *: $p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test, $n = 3$)

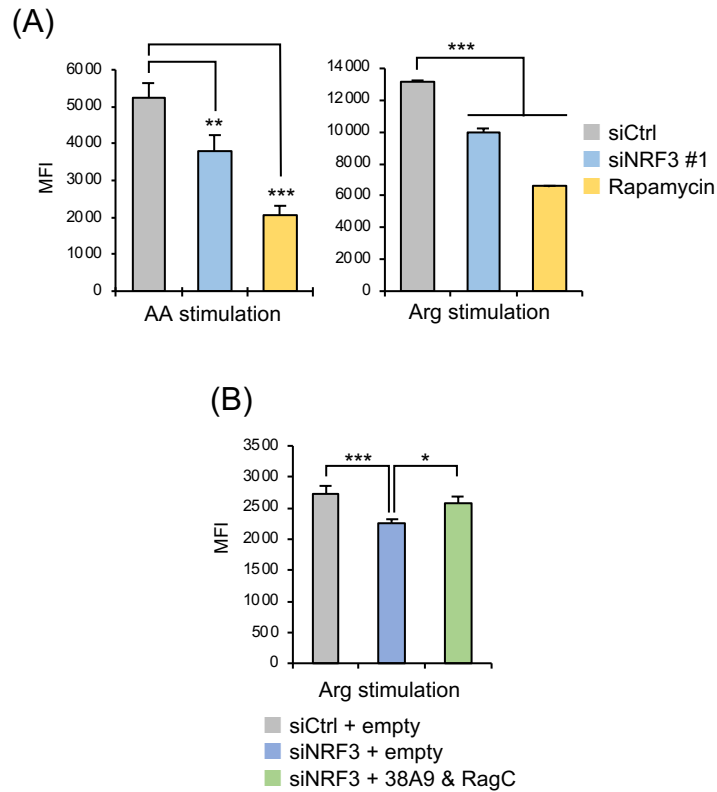


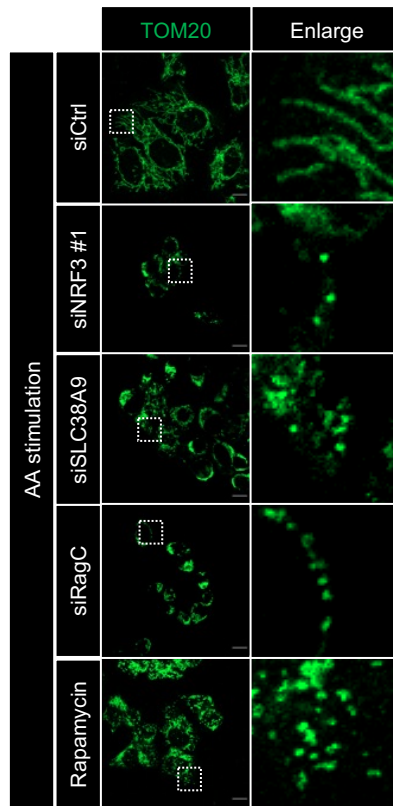
図4 1. アミノ酸またはアルギニン刺激下での NRF3 ノックダウンまたはラパマイシンのミトコンドリア膜電位への影響

(A) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、アミノ酸またはアルギニン欠乏培地で 5 時間培養し、さらにアミノ酸またはアルギニンで 15 分間再刺激した。なお、コントロールとして HCT116-siCtrl 細胞に 10 μ M ラパマイシンを加えてアミノ酸刺激した。その後、細胞を CMXRos で染色し、フローサイトメトリーにより蛍光強度の中央値(MFI)を測定した。

(B) HCT116 細胞を図 21 と同様に培養・刺激した。その後、細胞を CMXRos で染色し、フローサイトメトリーにより蛍光強度の中央値(MFI)を測定した。

(***: $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test, $n = 3$)

(A)



(B)

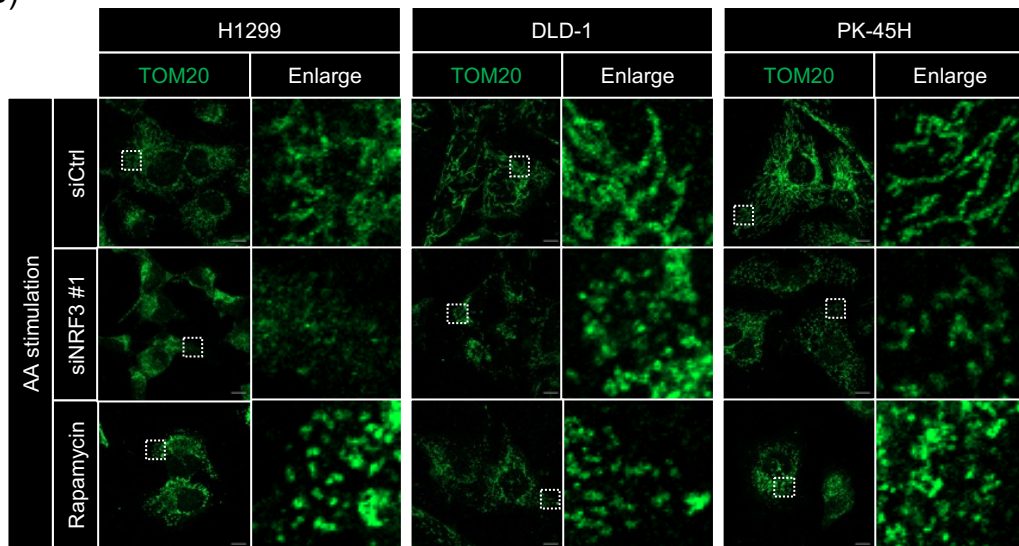


図4 2. アミノ酸刺激下でのミトコンドリア形態に対する NRF3 ノックダウンまたは mTORC1 阻害の影響

- (A) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、図 32 と同様に刺激した。
- (B) H1299、DLD-1、PK-45H 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。その後、アミノ酸欠乏培地で 16 時間培養し、さらにアミノ酸で 15 分間再刺激した。なお、コントロールとして HCT116-siCtrl 細胞に 10 μ M ラパマイシンを加えてアミノ酸刺激した。

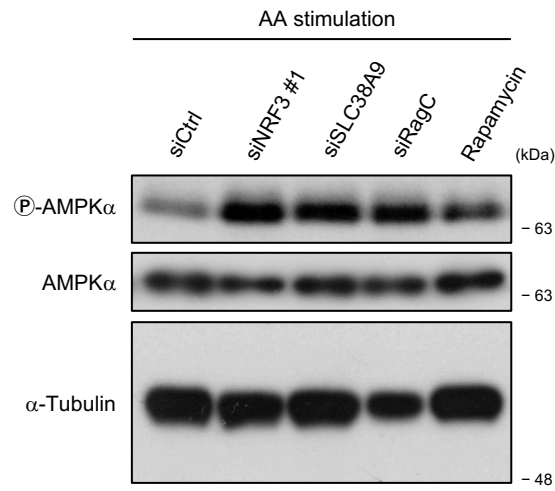


図4 3. アミノ酸刺激下での AMPK α リン酸化レベルに対する NRF3 ノックダウンまたは mTORC1 阻害の影響
HCT116 細胞を図 34 (A)と同様に培養・刺激した。

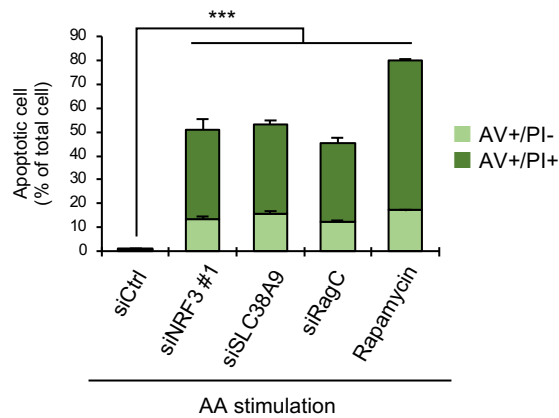


図4 4. アミノ酸刺激下でのアポトーシスに対する NRF3 ノックダウンまたは mTORC1 阻害の影響

HCT116 細胞を図 34 (A)と同様に培養・刺激した。その後、細胞をアネキシン V (AV) および PI で染色し、フローサイトメーターで検出した。AV+をアポトーシス細胞とし、その内、AV+/PI-を早期アポトーシス、AV+/PI+を後期アポトーシスとした。
 (***: $p < 0.005$, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

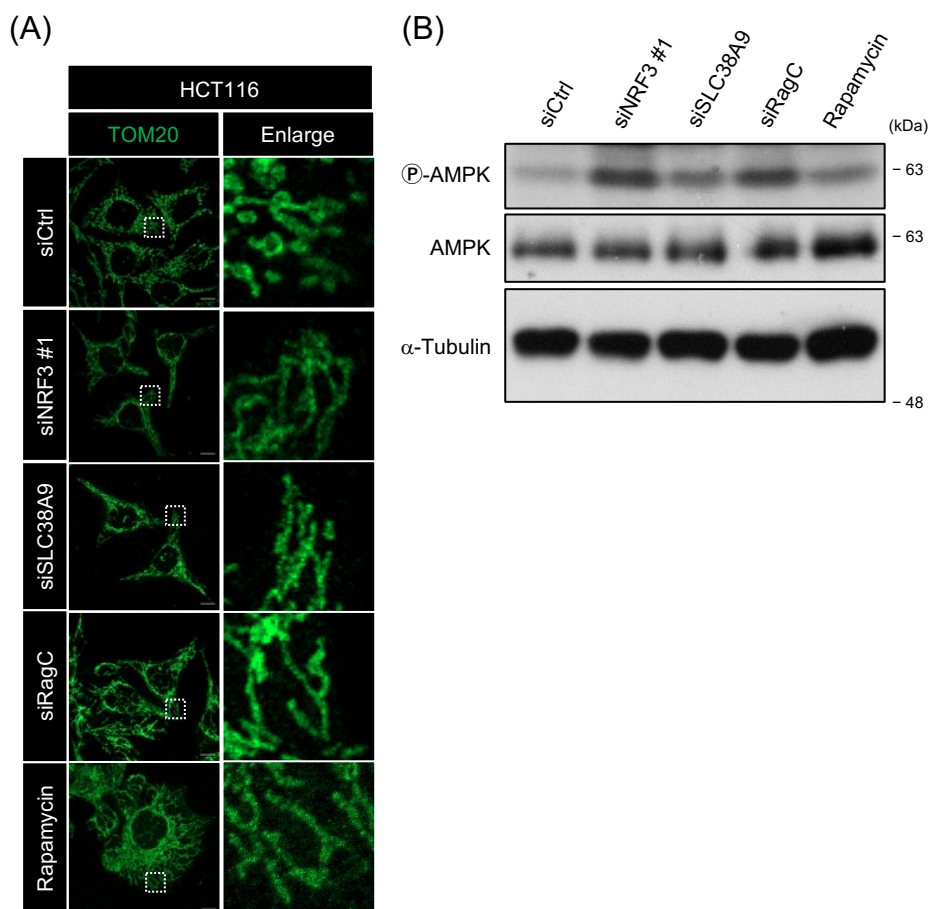


図 4 5. 通常培養下におけるミトコンドリア形態(A)および AMPK α (B)リン酸化レベルに対する NRF3 ノックダウンまたは mTORC1 阻害の影響

(A & B) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。なお、コントロールとして HCT116-siCtrl 細胞に 10 μ M ラパマイシンを加えて 2 日間培養した。

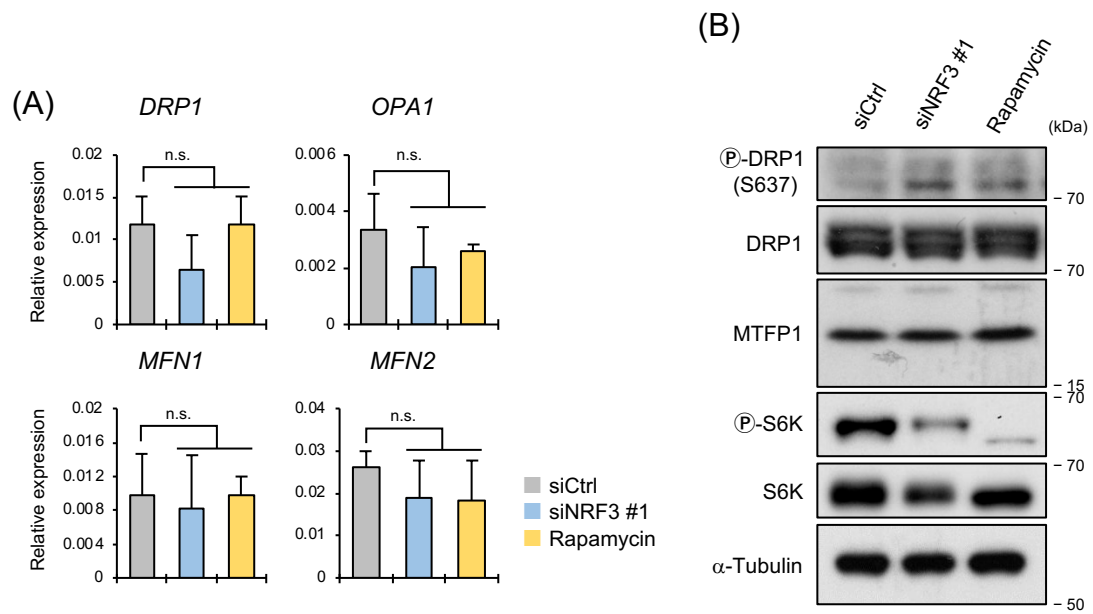


図 4 6. 通常培養下におけるミトコンドリア融合・分裂遺伝子の mRNA およびタンパク質・リン酸化レベルに対する NRF3 ノックダウンまたはラパマイシンの影響 (A & B) HCT116 細胞を図 37 と同様に培養・刺激した。(n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, n=3)

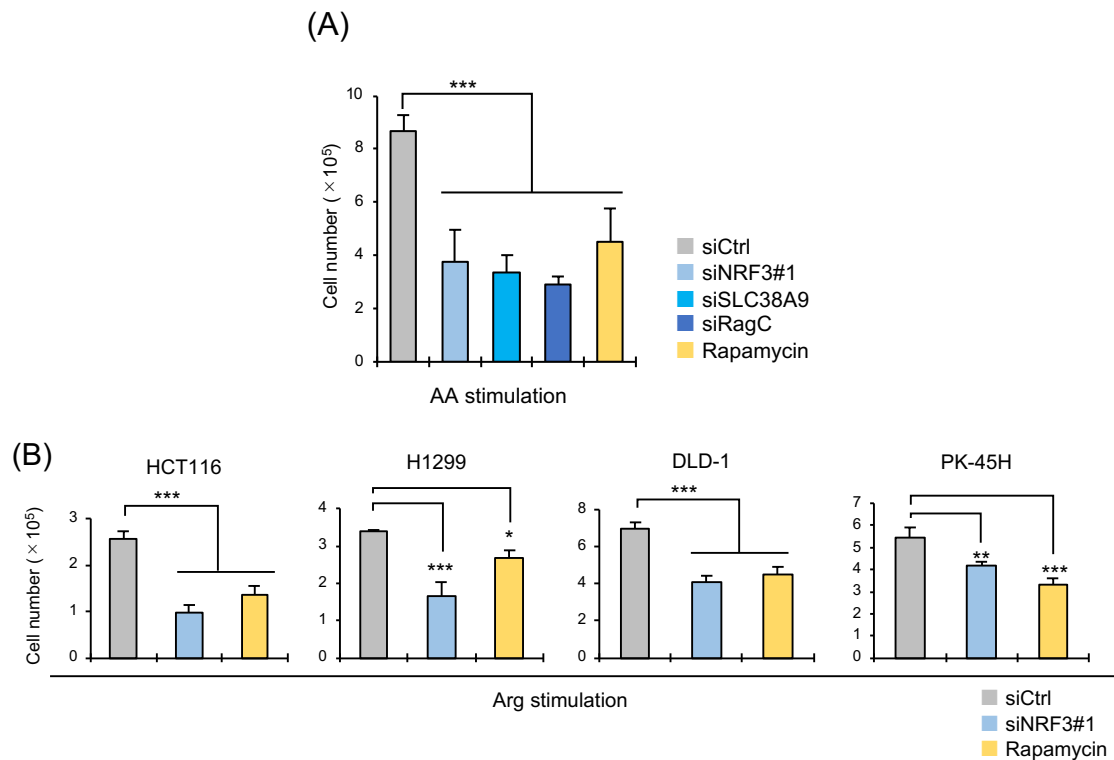


図4 7. アミノ酸またはアルギニン刺激下でのがん細胞の *in vitro* 増殖に対する NRF3 ノックダウンまたは mTORC1 阻害の影響

(A) HCT116 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。アミノ酸欠乏培地で 5 時間培養し、さらにアミノ酸で 15 分間再刺激した。その後、血球計数盤で細胞数をカウントした。なお、コントロールとして HCT116-siCtrl 細胞を 10 μ M ラパマイシンで 2 日間処理し、アミノ酸刺激を行った。

(B) HCT116、H1299、DLD-1、PK-45H 細胞に siRNA をトランスフェクションし、2 日間培養した。アルギニン欠乏培地で 16 時間培養し、さらにアルギニンで 15 分間再刺激した。その後、血球計数盤で細胞数をカウントした。なお、コントロールとして各細胞を 10 μ M ラパマイシンで 3 日間処理し、アルギニン刺激を行った。(***: $p < 0.005$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$)

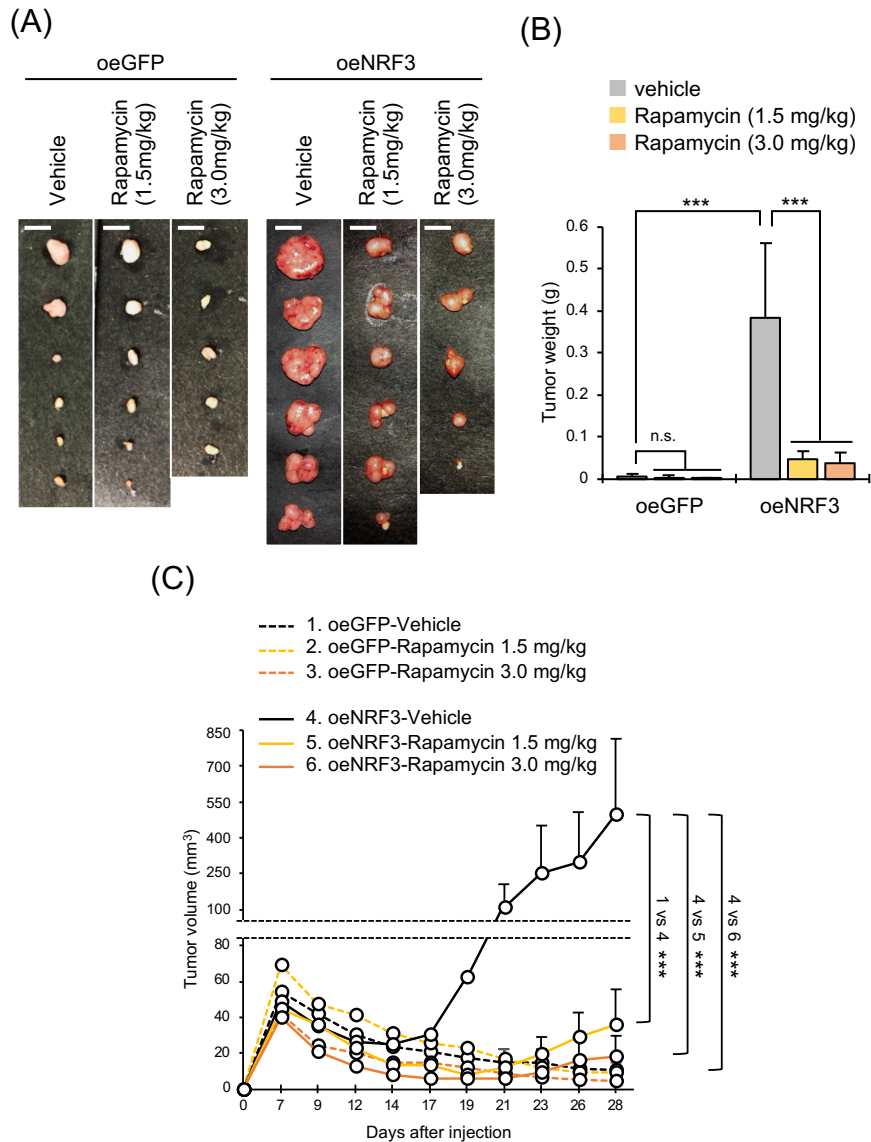
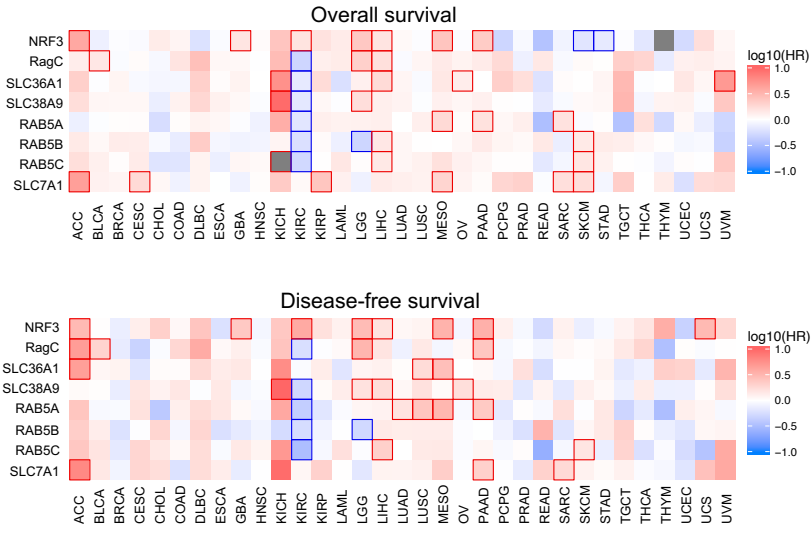


図4 8. マウス異種移植モデルにおける NRF3 依存的な腫瘍増大に対するラパマイシンの効果

(A-C) H1299-oeNRF3/oeGFP 細胞を BALB/cAJcl-Foxn1tm マウスに皮下移植した後、1 週間後にラパマイシン (1.5 mg/kg または 3.0 mg/kg) を 2 日に 1 回腹腔内投与した。移植後 4 週間の腫瘍の写真および重量を(A)および(B)に示し、腫瘍体積を経日変化を(C)に示した。scale bar: 5mm。 (***: p<0.005, n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, n=5, 6)

(A)



(B)

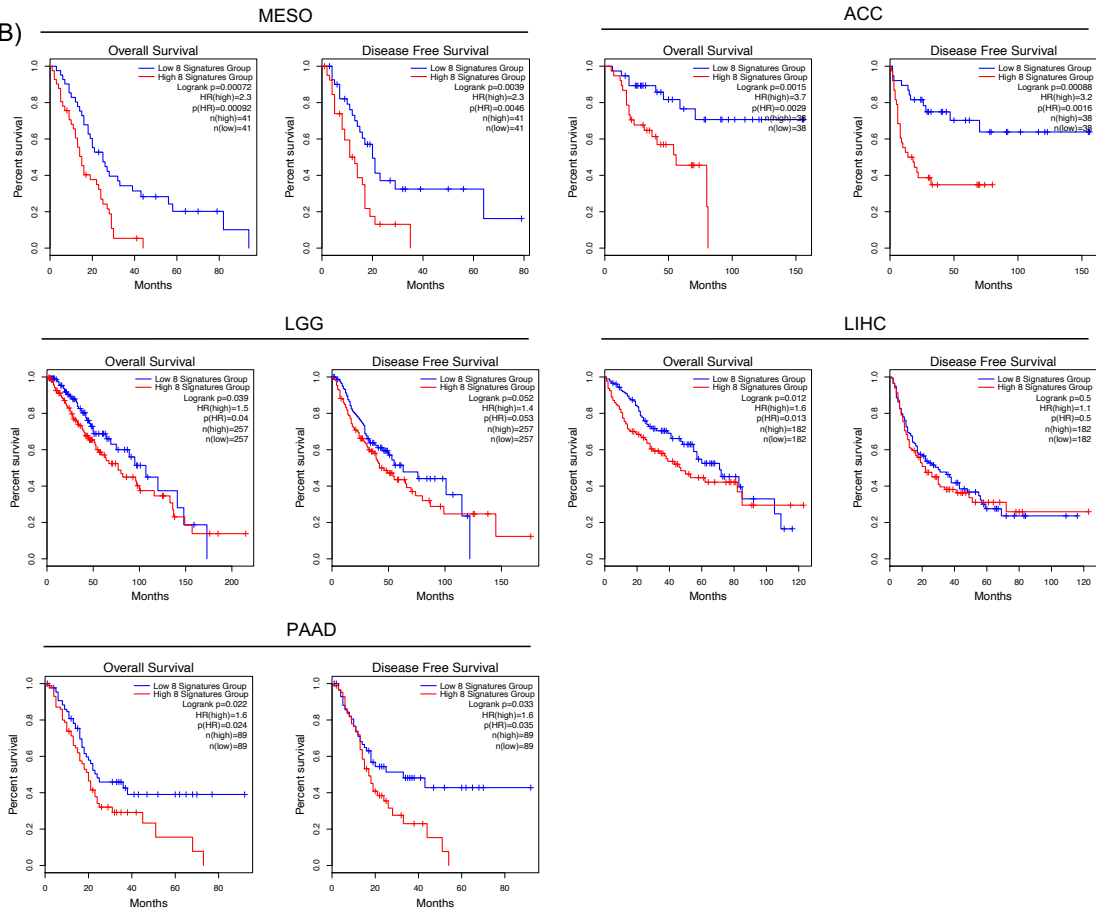


図49. 各がん種における NRF3-mTORC1 軸と生存率の相関

(A) NRF3-mTORC1 軸遺伝子(NRF3、SLC38A9、RagC、SLC36A1、RAB5A、RAB5B、RAB5C、SLC7A1)の発現量と全生存期間または無病生存期間の有意差マップ。Mantel-Cox 検定とハザード比 (HR) を用いて推定した。

(B) 中皮腫 (MESO)、副腎皮質がん (ACC)、低悪性度グリオーマ (LGG)、肝細胞がん (LIHC)、膵膵腺がん (PAAD) 患者における NRF3-mTORC1 軸遺伝子の発現量と全生存期間または無病生存期間を比較した Kaplan-Meier プロット。

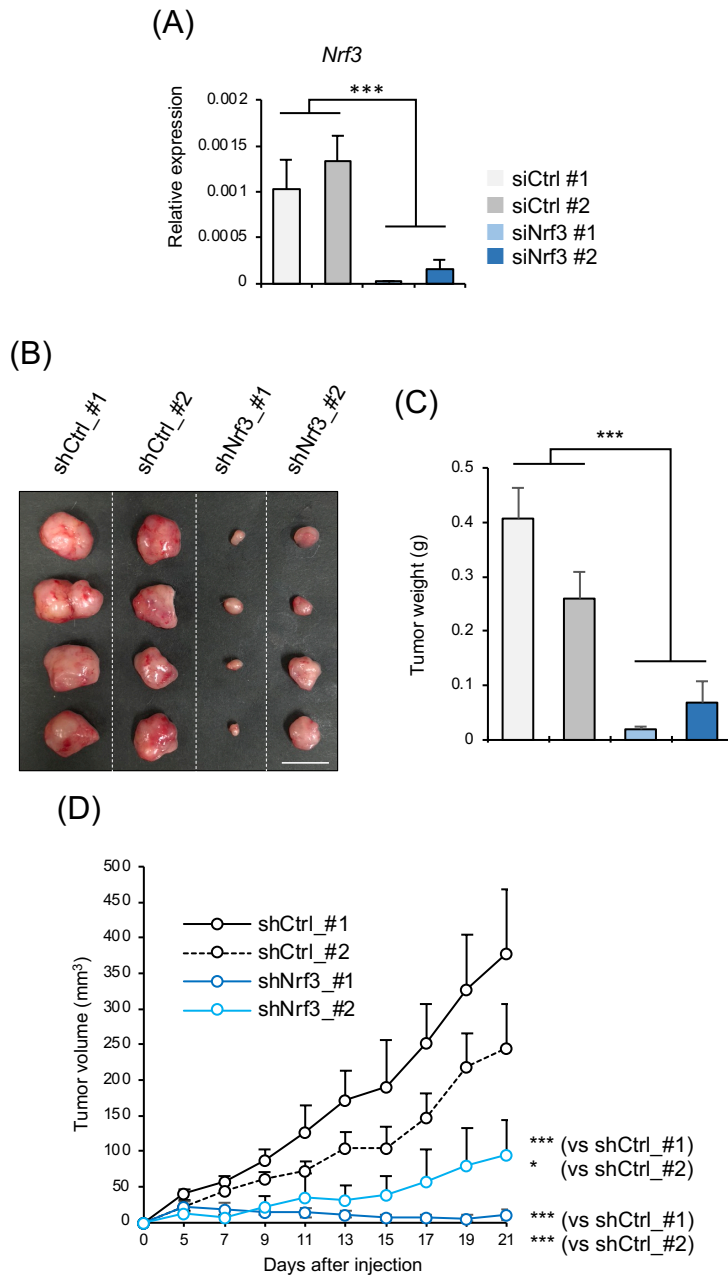


図50. 野生型マウス同種移植モデルにおける Nrf3 ノックダウンの腫瘍増大への影響
(A) RenCa-shNrf3 細胞のノックダウン効率。RenCa-shNrf3/shCtrl 細胞を 48 時間培養した。

(B-D) RenCa-shNrf3/shCtrl 細胞を BALB/cCrSlc マウスに皮下移植した。3 週間後の腫瘍の写真および重量を(B)および(C)に示し、腫瘍体積の経日変化を(D)に示した。(***: $p < 0.005$, *: $p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test, $n=4$)

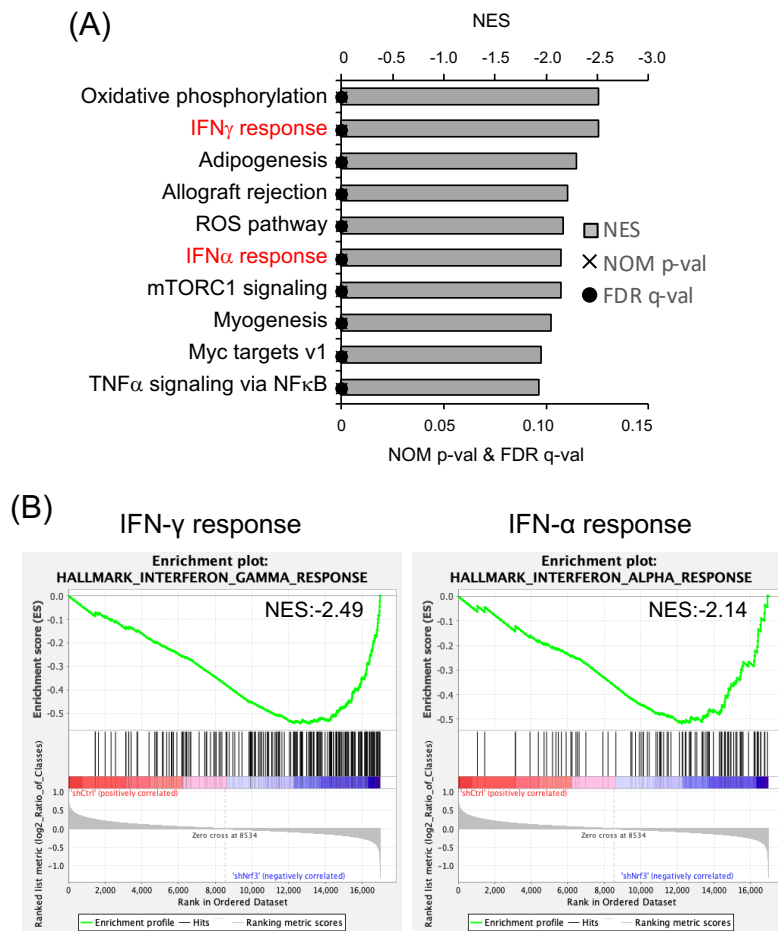


図5 1. 野生型マウス移植腫瘍のマイクロアレイ解析

(A & B) RenCa-shNrf3/shCtrl腫瘍のGSEA解析。RenCa-shNrf3/shCtrl細胞をBALB/cCrSlcマウスに皮下移植して得た腫瘍のマイクロアレイ解析データを用いて、GSEAを行った。(A)では遺伝子セットのランクをnormalized enrichment score (NES)の低い順に並べた。(B)は、"IFN- γ response"および"IFN- α response"のエンリッチメントプロットを示している。(NOM p-val: nominal p value, FDR q-val: false discovery rate q value)

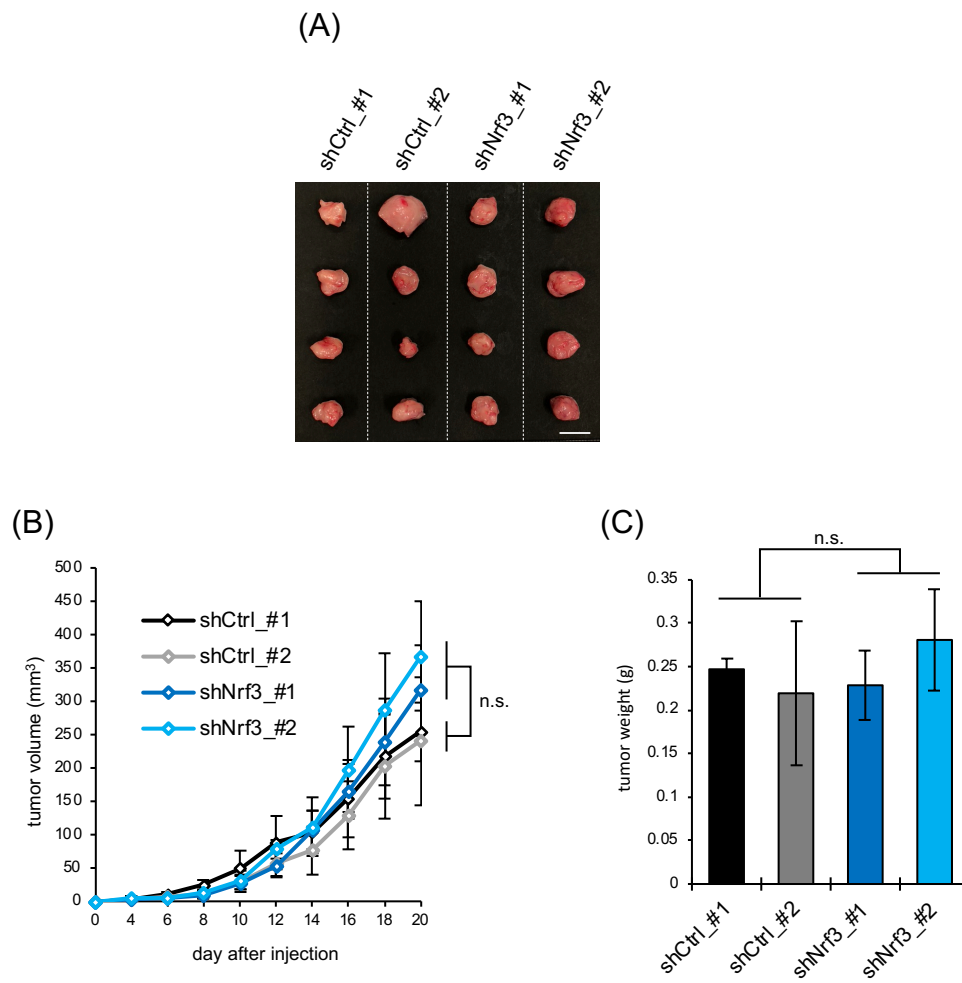


図5 2. T細胞欠如マウス同種移植モデルにおける Nrf3 ノックダウンの腫瘍増大への影響

(A-C) RenCa-shNrf3/shCtrl細胞を BALB/cAJcl-Foxn1^{nu/nu}マウスに皮下移植した。3週間後の腫瘍の写真および重量を(A)および(B)に示し、腫瘍体積の経日変化を(C)に示した。(n.s.: not significant, ANOVA followed by Tukey's test, n=4)

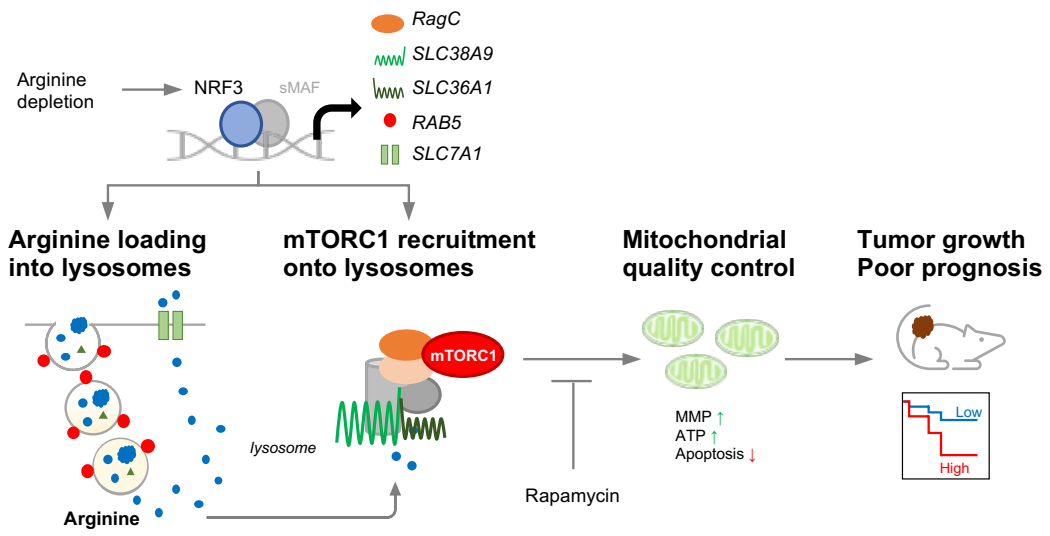


図 5 3 . 本研究のモデル図

表1. オリゴヌクレオチド配列

RT-qPCR		
Target gene	Forward primer	Reverse primer
human NRF1	TGGAACAGCAGTGGCAAGATCTCA	GGCACTGTACAGGATTTCACTTGC
human NRF2	TACTCCCAGGTTGCCACA	CATCTACAAACGGGAATGTCTGC
human NRF3	CTGACTGGGAGGCAGAAAAG	TCAGGCTGTGATGAAAGCAA
human SLC38A9	AGGCTACCTGGCTCGTGT	CCATGATCACTCCAGCTCCC
human RagA	CCTGGTGACAAAAATGGATCTG	AGGCTTTGTAGAGCGTCTCATC
human RagB	TTGAACCTGTGGGATTGTGGT	TTTCGGAAAGATGTTGTCCCGT
human RagC	TTGCAGATGTGGGCTAGAAA	TAGGTTTTCCAAGGTCGGCAG
human RagD	GGCTCTCGTTTTGCTTTGTGAG	GCAGCCGATTCTGAACCTTTC
human SLC36A1	TCCAAGGCAGCATAACCCTC	ATCTCAGCCGGGACGTAGAA
human RAB5A	ACAGCTGGTCAAGAACGA	GACTTGTCTTGCCTCTGAA
human RAB5B	TGGAGACTTCAGCCAAGA	TGTTCTGCTGGGACTGTT
human RAB5C	GGTGAAGGAGCTACAGAGG	ATGTCTCCATGAACAGCAA
human SLC7A1	CGAGTTTGGTGCTCGGGT	GCCTCGCTACGCTTGAA
human DRP1	GCTCCAGGACGTCTTCAACA	TAGCACTGAGCTCTTTCCGC
human OPA1	ACGGCGTTTAGAGCAACAGA	CTATATTGCCAGCGGCTCT
human MFN1	TCCGGAACCTTGATCGAATAGCC	AGCTCTTCCCAGCTGCTTGTG
human MFN2	TCTCCCGCCAACATCTTC	ACCAGGAAGCTGGTACAACG
human β -actin	CCAACCGCGAGAAGAT	CCAGAGCGGTACAGG
mouse Nrf3	ACCGAGGCTAGGAACGAGA	CACTGAGATGCCCTCCAGA
mouse β -actin	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG

ChIP-qPCR		
Target region	Forward primer	Reverse primer
human SLC38A9	GAGGGGTAGTAGAAGGAATGCAA	CTAGACGACGGAGGGAGCAT
human RagC	CTACTCGAGAGCAGCAGGGTAG	CATCTCCATAGCGGTGCTCT
human SLC36A1	AGTCTCTCCCTTTTAGCTGTC	CTATCTTCCCAGAAGCACATTCC
human SLC7A1	GACTTCAACTCTCCAGCAACTC	CTCTCTGCACAAATCCAAGTAC

siRNA		
Target gene	Sense	Antisense
human NRF3 #1	GGAUCAAGUGAUUCUGAUTT	AUCAGAAUCACUUUGAUCCAA
human NRF3 #2	GCAAAGAAGGAAACUCUUATT	UAAGAGUUUCCUUCUUUGCUU
human DD12	GCCAAAGUAGUGAUGCUUUATT	UAAAGCAUCACUACUUGGCTT
human SLC38A9	GUUUUJUGGGUGCUUAUGUTT	ACAUAAGCACCCAAUAACTT
human RagC	GACAUGAUCGAUGUUGUAATT	UUACAACUCCGAUCAGUUCTT
human RAB5A	CAAUGUACCCGUAAUUUGUTT	ACAAAUUACGGGUACAUUGTT
human RAB5B	CUUACAACUGGCUCAUUAUUTT	AAUUAUGAGCCAGUUGUAAGTT
human RAB5C	CAAUGAACGUGAACGAAUUTT	AUUUCGUUCACGUUCAUUGTT
human SLC7A1	GCUUCAAUGAGUUUAAGGATT	UCCUUAAACUCAUUGAAGCTT
Control siRNA (siCtrl)	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAAATT

shRNA		
Target gene	Sense	Antisense
Ctrl	TCGAGG TTCTCCGAACGTGTCACGT TTCAAGAGA ACGTGACACGTTTCGGAGAA TTTTTT ACGCCTA	AGCTTACGCGT AAAAAA TTCTCCGAACGTGTCACGT TCTTTGAA ACGTGACACGTTTCGGAGAA CC
mouse Nrf3	CACC CTGTCTGTAATGTAACCTGA GTGTGCTGTCC TCTAGTTTACGTTTACGGCAG TTTTTT	GCAT AAAAAA CTGCCGTAACGTAACCTAGA GGACAGCACAC TCAAGTTTACATTTACGACAG

表2. 抗体リスト

Target	メーカー	カタログ#
Rabbit monoclonal phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (108D2) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9234; RRID:AB_2269803
Rabbit monoclonal p70 S6 kinase (49D7) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 2708; RRID:AB_390722
Rabbit polyclonal phospho-Akt (S473) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9271; RRID:AB_329825
Rabbit monoclonal Akt (pan) (C67E7) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 4691; RRID:AB_915783
Rabbit monoclonal mTOR (7C10) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 2983; RRID:2105622
Mouse monoclonal LAMP-1 (H4A3) antibody	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-20011; RRID:AB_626853
Rabbit polyclonal Sestrin2 antibody	Proteintech	Cat# 10795-1-AP; RRID:AB_218540
Mouse monoclonal FLAG M2 antibody	Sigma-Aldrich	Cat# F1804; RRID:AB_262044
Rabbit polyclonal SLC38A9 antibody	Sigma-Aldrich	Cat# HPA043785; RRID:AB_10961859
Rabbit monoclonal RagC (D8H5) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9480; RRID:AB_10614716
Rabbit polyclonal SLC36A1 antibody	Abcam	Cat# ab189441
Mouse monoclonal TOM20 (F-10) antibody	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-17764; RRID:AB_628381
Rabbit monoclonal phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 2535; RRID:AB_331250
Rabbit polyclonal AMPK α antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 2532; RRID:AB_330331
Rabbit monoclonal phospho-DRP1 (S637) (D3A4) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 6319; RRID:AB_10971640
Rabbit monoclonal DRP1 (D6C7) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 8570; RRID:AB_10950498
Rabbit polyclonal MTP18 antibody	Abcam	Cat# ab198217
Mouse human NRF3 (#9408) antibody	RIKEN-BRC	RCB4901
Mouse monoclonal α -Tubulin antibody	Sigma-Aldrich	Cat# T9026; RRID:AB_477593
Mouse monoclonal GFP (B-2) antibody	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-9996; RRID:AB_627695
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific	Cat# 65-6120; RRID:AB_2533967
Goat anti-Mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate	Thermo Fisher Scientific	Cat# G-21040; RRID:AB_2536527
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11034; RRID:AB_2576217
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11030; RRID:AB_2534089
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11029; RRID:AB_2534088