

令和元年5月24日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14991

研究課題名(和文) JSAPによる染色体分配制御とその破綻がもたらすがんの発生・悪性の分子機構

研究課題名(英文) Functional analysis of JSAP in the regulation of chromosome segregation and cancer

研究代表者

中里 亮太 (Nakazato, Ryota)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：30761803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂制御の破綻は、細胞のがん化やがんの悪性の原因とも考えられており、正確な細胞分裂制御は極めて重要な機能であるが、未だ不明な点が多い。本研究では、がん細胞マーカーとしても知られる細胞内輸送制御因子JSAPの機能解析を通じ、細胞分裂制御機構の解明を試みた。その結果、JSAP欠損細胞では、細胞分裂期における染色体の分配異常、それに伴う染色体数の異常を示す細胞が多数観察された。さらに、細胞分裂制御因子の1つであるPLK1の細胞内局在性の異常も観察された。以上の結果から、JSAPはタンパク質の細胞内局在性を制御することにより、細胞分裂制御機構において重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常の細胞分裂では、複製された染色体が正確かつ均等に分配されるが、多くのがん細胞では染色体の分配異常が認められ、細胞のがん化やがんの悪性の原因とされている。そのため、細胞分裂制御機構の解明は非常に重要な課題である。本研究結果では細胞内輸送因子JSAPが細胞分裂制御機構において非常に重要な役割を持つことを明らかにした。本研究は細胞内輸送制御因子という、まったく新しい視点からの研究であり、本研究結果は未だ不明な点が多い細胞分裂制御機構の解明に大きく貢献すると考えられることから、非常に学術的意義が高く、また、本研究結果はがんの治療・予防法の確立に貢献すると考えられ、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The process of cell division is tightly regulated by cell cycle checkpoints. A failure of cell division is often associated with cellular transformation and tumorigenesis. Recent studies suggests that JSAP is a novel biomarker for various types of cancer. In this study, we investigated the effect of JSAP on cell division in mammalian cells. JSAP knockout caused lagging chromosomes and aneuploidy. Moreover, abnormal subcellular distribution of PLK1 is observed in JSAP knockout cells. Together, these findings suggest that JSAP plays a critical role in the regulation of chromosome segregation during mitotic cell division.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌 細胞分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体不安定性 (chromosomal instability ; CIN)は様々な種類のがん細胞 (80%以上の固形腫瘍、50%以上のリンパ腫)で認められる性質である。通常の細胞分裂時に複製される染色体は、様々な分子による制御機構により正確かつ均等に娘細胞へ分配されるが、多くのがん細胞では、中心体の異常複製や、染色体の紡錘体赤道面上への整列障害などにより、染色体の分配異常が起こるとされている。これらの細胞はM期チェックポイントにより細胞周期の進行が阻害され、細胞死により取り除かれるが、これを免れた細胞は染色体の異数性や構造異常を有し、がん関連遺伝子 (がん原遺伝子やがん抑制遺伝子) の発現に変化が生じることで、細胞のがん化や、がんの悪性化が促進すると考えられている。

足場タンパク質 JSAP (JNK/SAPK-associated protein)は、機能的冗長性を持つ JSAP1 と JSAP2(別名 SPAG9, JIP4)が知られ、JNK 情報伝達経路の新規足場タンパク質として発見された。さらに、モータータンパク質であるキネシン-1 と積荷タンパク質を連結させるアダプター分子としての機能が知られており、細胞内で様々な役割をもつことが明らかとなってきた。また、近年では様々ながん細胞において JSAP2 の発現が亢進していることが明らかとなり、がん細胞の新規バイオマーカーとしても非常に注目を集めている分子である (*Am. J. Pathol.* 178:1009-1020, 2011; *Oncol. Rep.* 32:2533-2540, 2014)。実際、肝細胞癌や非小細胞肺癌では、JSAP2 の発現亢進と予後不良の関連も報告されている (*Lung Cancer* 81:266-272, 2013; *Tumour Biol.* 35:7685-7691, 2014)。また、我々のこれまでの研究成果より、JSAP を発現亢進した細胞では、分裂期である M 期の細胞において、中心体数の増加や、染色体の分配異常といった CIN 様の表現型を示すことを明らかにしてきた。さらに興味深いことに、キネシン-1 との結合能を欠いた変異型 JSAP を発現亢進させた場合では、この様な表現型は観察されなかった。これらの学術的背景から、がん細胞における JSAP の発現亢進は、染色体分配制御機構の破綻により CIN を引き起こす重要な要因であり、さらにそれはモータータンパク質であるキネシンを介した細胞内輸送制御機構の機能不全によりもたらされるものではないかという考えに至った。

また、近年の研究成果により、正確な染色体分配制御機構に必要とされる様々な分子の発見、および機能的役割が明らかになっている。実際に、それらの破綻が染色体不安定性を通して細胞のがん化、がんの悪性化を誘導するというモデルは強い支持を得ている。また、これらの分子は細胞分裂期においてその細胞内局在をダイナミックに変化させることが知られており、適切なタイミングと位置に局在することが重要となる。実際にこれら分子の局在レベルの低下は、染色体不安定性を誘発することが知られており、細胞内輸送システムを介した時空間的な制御機構の解明は、染色体不安定性誘導機序を真に理解する上では避けては通れない。しかしながら、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、染色体不安定性誘導機序、およびそれを予防するシステムである細胞分裂制御機構を、細胞内輸送制御因子である JSAP の機能解析を通じた時空間的な制御システムの観点から解明することができるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、未だ不明な点が多い CIN 誘導機序、およびそれを予防する細胞分裂制御機構を、足場タンパク質 JSAP を介した細胞内輸送制御の観点から明らかにすることを目的とした。それを踏まえ、JSAP 欠損細胞を作製することにより、細胞分裂時における染色体分配過程での機能的役割について、特に、細胞分裂制御因子の細胞内局在性への影響に着目し、解明を試みた。

3. 研究の方法

(1)JSAP 欠損細胞の作製および解析

JSAP1,2 を Cre/LoxP によりダブルまたはシングルノックアウトすることができるマウス (*Jsap1,2^{fllox}* マウス) よりマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を調製し、Cre 発現アデノウイルスを用いて JSAP 欠損 MEF を作製した。またヒト由来の細胞株である HCT116 を用いて、CRISPR/Cas9 システムにより JSAP 欠損細胞作製した。

上記で作製した JSAP 欠損細胞に GFP 融合 H2B 発現レンチウイルスベクターを遺伝子導入することで、染色体を GFP で蛍光標識し、タイムラプス法を用いて、生細胞の細胞分裂期における染色体の分配過程を観察し、JSAP の影響について検討を行った。

また、ギムザ染色により、上記で作製した細胞の染色体数についても検討を行った。

(2)JSAP による細胞分裂制御因子の細胞内局在性への影響についての解析

JSAP 欠損 MEF へ各種 GFP 融合細胞分裂制御因子発現レンチウイルスベクターを遺伝子導入し、蛍光標識された細胞分裂制御因子の、細胞分裂期における細胞内局在を免疫染色により検討を行った。

4. 研究成果

(1)JSAP1、JSAP2 両欠損 MEF では細胞分裂期の M 期後期において染色体不安定性の指標でもあ

る遅滞染色体 (lagging chromosome) を示す細胞が多数観察された。しかしながら、JSAP1 または JSAP2 のみ欠損させた MEF では遅滞染色体はほとんど観察されなかった。また、ヒト由来の細胞である HCT116 においては、CRISPR/Cas9 システムにより JSAP1 を欠損させたのち、JSAP2 に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターを遺伝子導入したところ、MEF と同様、遅滞染色体を示す細胞が多数観察された。

また、ギムザ染色により、JSAP1、JSAP2 両欠損 MEF における染色体数について検討を行ったところ、通常は 40 本であるはずの染色体が、40 本より少ない、または多い細胞、すなわち、がん細胞の特徴の 1 つである異数性を示す細胞が多数観察された (図 1)。

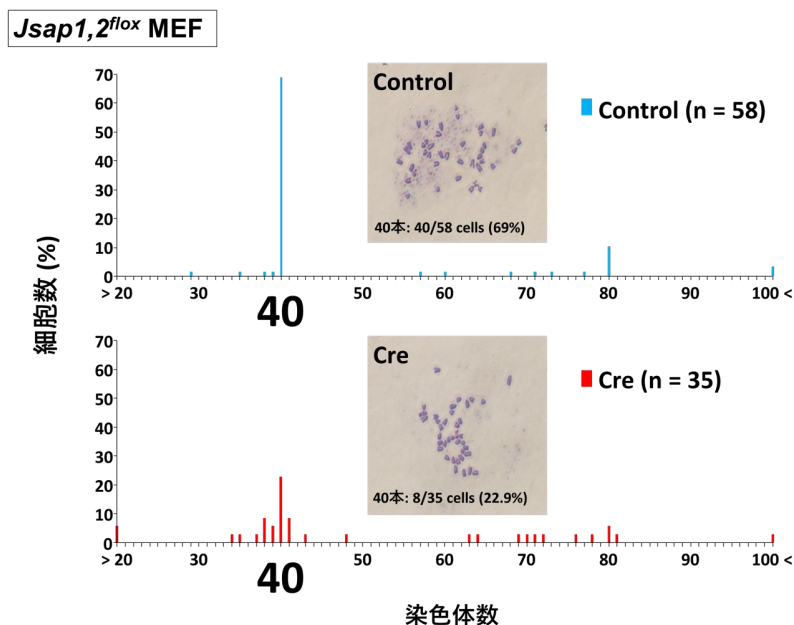


図 1 ギムザ染色

(2) JSAP1、JSAP2 両欠損 MEF に各種 GFP 融合細胞分裂制御因子発現ベクターを遺伝子導入したところ、M 期において、細胞分裂制御因子の 1 つである PLK1 のシグナルが染色体の動原体へ過剰に集積している様子が、免疫蛍光染色により観察された (図 2)。

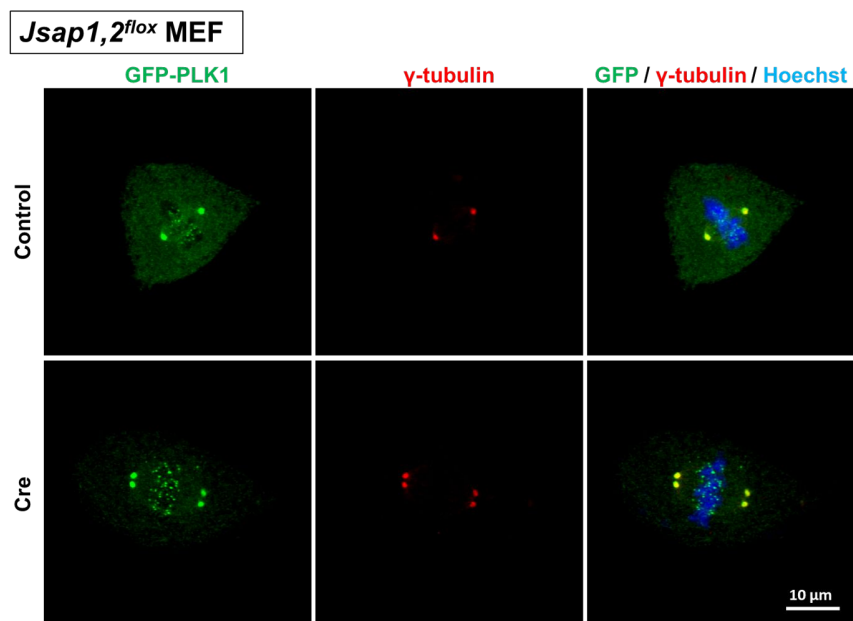


図 2 免疫染色

本研究成果より、JSAP は細胞分裂制御因子 PLK1 の細胞内局在性を制御することにより、細胞分裂時における染色体の分配異常、および、それに伴う染色体の異数化を防いでいると考えられる。本研究成果は足場タンパク質を介した細胞内輸送制御と、染色体分配の関係性を示す、まったく新たな知見であり、細胞分裂制御に関する研究の発展、および、がん治療・予防法の確立に大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中里亮太

Functional analysis of JSAP in the regulation of chromosome segregation

2017年度生命科学系学会合同年次会

2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学がん進展制御研究所シグナル伝達研究分野ホームページ

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/yoshiokaHP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: