

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06234

研究課題名(和文)足場タンパク質JSAPによる細胞のがん化と細胞分裂制御機構

研究課題名(英文)The functional role of JSAP in cell division control 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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：正確な細胞分裂制御は、細胞のがん化や悪性化を防ぐ観点からも、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、近年、様々ながん細胞において高発現していることが知られ、細胞内輸送制御因子でもある足場タンパク質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、HeLa細胞において、JSAPの高発現は、多核化などの核形態異常、細胞分裂期における中心体数の異常や多極紡錘体を引き起こし、それらはモータータンパク質であるキネシンとの結合を通して引き起こされたことから、細胞分裂制御機構において、JSAPは細胞内輸送制御を介して重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Proper cell cycle regulation is essential for normal cell function, and its dysregulation is often associated with cellular transformation and tumorigenesis. Recent studies have reported that overexpression of JSAP2 is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma and non-small cell lung cancer. In this study, we investigated the effect of high expression of JSAP on cultured cells. Overexpression of wild-type JSAP (JSAP_{WT}), but not mutant JSAP lacking kinesin-1 heavy chain-binding domain (KBD) (JSAP_{KBD}), caused nuclear morphological abnormalities. Furthermore, centrosome amplification and multipolar spindles were observed in HeLa cells overexpressing JSAP_{WT}, but not JSAP_{KBD}. Together, these findings may suggest that JSAP plays a critical role in the regulation of mitosis, particularly chromosome segregation through interaction with kinesin-1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂時における複製された染色体の正確な娘細胞への分配は、多細胞生物における生命の維持において不可欠であり、さまざまな調節タンパク質から形成される複雑なネットワークにより制御されている。また、がん化細胞では染色不安定性により染色体の分配異常が生じやすく、がん化や悪性化を促進すると考えられている。分配異常の原因としては、細胞分裂時における中心体の成熟不全(Ozaki et al., Mol Cell. 2012)、中心体の不安定化(Oshimori et al., Nat Cell Biol. 2006)、染色体の紡錘体赤道面上への整列障害、散乱(Chiba et al., Curr Biol. 2009)などが知られている。これらの多くの細胞はアポトーシスにより死滅するが、一部の細胞は多核や小核などの核形態異常を示し、細胞のがん化や悪性化につながるとされる。近年の研究により、染色体の分配制御機構や染色不安定性のメカニズムは徐々に明らかとなってきたものの、未だその詳細は不明である。

一方、足場タンパク質 JSAP(c-jun NH2-terminal kinase (JNK) / stress-activated protein kinase-associated protein) は、JNK 情報伝達経路の足場タンパク質としての役割だけでなく、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するアダプター分子としての機能も知られており、近年では細胞内で様々な役割をもつことが明らかとなってきた(Sato et al., Cell Death Differ. 2015)。また、足場タンパク質 JSAP1, 2 を欠損した MEF において細胞分裂の遅延が起こることを明らかとした(Tuvshintugs et al., Genes Cells. 2014)。そこで、JSAP タンパクの、細胞分裂時における細胞内分布等を調べる目的で、HA タグ融合 JSAP1 および JSAP2 発現レンチウイルスベクターを作製し、レンチウイルスを用いて HeLa 細胞へ遺伝子導入を行ったところ、多核化や小核化などの核形態異常を示す細胞が多数観察された。すなわち、高発現 JSAP タンパクは染色体分配制御機構の破綻、または染色不安定性に関与し、細胞の核形態異常を引き起こす可能性が示唆された。

実際に、足場タンパク質である SPAG9 (別名 JSAP2, JIP4) が、がん細胞において高発現し、バイオマーカーとなりうるという研究成果が近年いくつかの研究機関から報告されている(Sinha et al., J Exp Clin Cancer Res. 2013; Wang et al., Lung Cancer. 2013)。しかしながら、その役割や機能発現メカニズムの十分な解明には至っていない。また、JSAP はモータータンパク質であるキネシンやダイニンと、それらの積荷タンパク質を連結するアダプター分子としての機能が知られており、中心体の成熟過程における中心体周辺物質の集積には、ダイニンによる微小管依存的メカニズムも報告されている

(Blagden et al., Nat Cell Biol. 2003)。

これらの学術的背景から、「JSAP が細胞分裂時における染色体分配メカニズムを制御する」という研究仮説を構築し、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では足場タンパク質という全く新たな視点から、細胞分裂制御機構の解明を目的とした。それを踏まえ、JSAP 発現増加により引き起こされる異常が、JSAP の、どのような機能依存的であるかを明らかにし、さらに、細胞分裂時において、正常な染色体分配を行うのに必須である、中心体の複製・安定化の制御における JSAP の役割について、解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 各種変異 JSAP 発現ベクターの遺伝子導入による、核形態異常の解析

各種変異 JSAP 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ遺伝子導入後、免疫細胞化学法により核形態異常の有無を観察することで、JSAP 発現増加による核形態異常の惹起が、JSAP のどの機能ドメイン依存的であるかを検討した。

(2) 中心体の複製・安定化における JSAP の機能的役割についての解析

JSAP 発現ベクターの遺伝子導入により、JSAP が発現増加した HeLa 細胞を作製し、 α -チューブリン(微小管)および γ -チューブリン(中心体)の免疫細胞化学染色を行い、分裂期である M 期における紡錘体形成、中心体数について検討を行った。さらに、蛍光標識された α -チューブリン安定発現 HeLa 細胞に JSAP の発現を増加させ、タイムラプス解析により、微小管の構造変化を経時的に捉え、検討を行った。

4. 研究成果

(1) キネシンとの結合ドメインを欠損した変異型 JSAP を発現する、JSAP_{KBD} 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞に遺伝子導入を行った。その結果、野生型 JSAP (JSAP_{WT}) 発現ベクターの遺伝子導入で多数認められた、多核化などの核形態異常を持つ細胞は、ほとんど認められなかった。また、キネシンとの結合ドメインのみを発現する KBD 発現ベクターを、HeLa 細胞に遺伝子導入を行った場合でも、核形態異常を持つ細胞は、JSAP_{KBD} 同様、ほとんど認められなかった。以上の結果から、JSAP 発現増加により惹起される核形態異常は、モータータンパク質であるキネシンとの結合を介した、細胞内輸送機構の異常が原因である可能性が示唆された。

一方、細胞質分裂に重要な因子でもある、低分子量 G タンパク質 ARF6 と結合すること

が知られている、JSAP のロイシンジッパードメイン(LZ)を変異させた、JSAP_LZ 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ遺伝子導入を行った場合には、野生型 JSAP と同様、多数の核形態異常を持つ細胞が観察された。以上の結果から、本研究で認められる、JSAP 発現増加による核形態異常の惹起は、ARF6 非依存的であると考えられる。

(2)野生型 JSAP (JSAP_WT) 発現ベクターを遺伝子導入した HeLa 細胞において、 γ -チューブリン抗体を用いて免疫細胞化学染色を行ったところ、細胞周期の M 期において、1 つの細胞に本来 2 つであるはずの中心体が、3 つ以上ある細胞が多数観察された。また、 α -チューブリン抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った場合には、双極であるはずの紡錘体が、多数の極を持った多極紡錘体を有する細胞が高頻度で観察された。一方、JSAP_KBD 発現ベクターを遺伝子導入した HeLa 細胞においては、中心体数の異常や、多極紡錘体を有する細胞はほとんど認められなかった(図 1)。

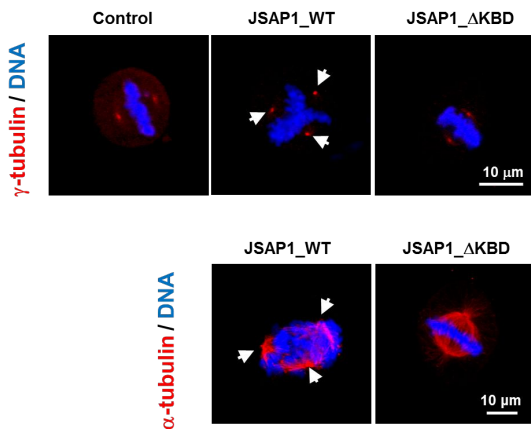


図1 免疫細胞化学染色

蛍光標識された γ -チューブリン安定発現 HeLa 細胞へ、野生型 JSAP 発現ベクター遺伝子導入し、タイムラプス解析を行ったところ、免疫細胞化学染色の結果と同様、多極紡錘体が観察された。さらに、野生型 JSAP 発現ベクターを遺伝子導入した多くの細胞で、M 期の時間が長くなり、最終的に死んでしまう様子が観察された。一方、JSAP_KBD 発現ベクターを遺伝子導入した細胞では、このような現象は観察されなかった(図 2)。

以上の結果から、JSAP の発現増加は、M 期における中心体数の異常、多極紡錘体を引き起こし、多くの細胞は細胞死により取り除かれるが、一部の細胞は染色体の分配異常が引き起こされ、多核化などの核形態異常を有する可能性が示唆された。さらに、キネシン結合ドメインを欠損した JSAP の発現を増加させた場合には、これらの現象が観察されないことから、キネシンを介した細胞内輸送機構の異常が原因と考えられる。

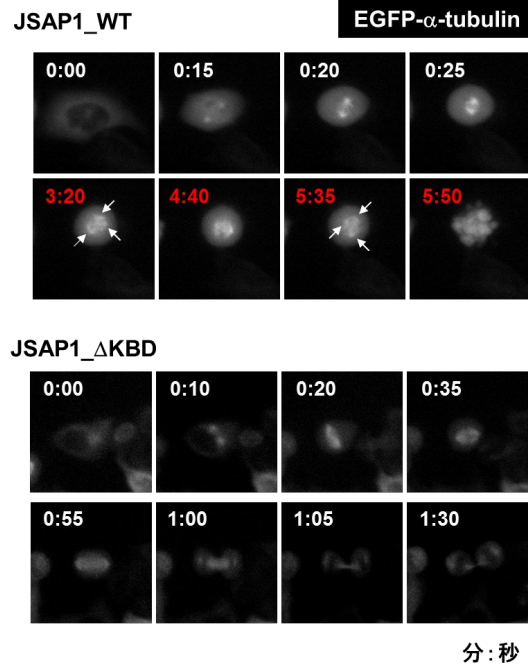


図2 タイムラプス画像

本研究成果から得られた、足場タンパク質を介した細胞内輸送制御と、細胞分裂制御機構の関係性を示す知見は、全く新しいものであり、未だ不明な点が多い、細胞分裂制御に関する研究の発展に、大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中里 亮太

Role of JSAP in cell division control and cancer.

第 75 回日本癌学会学術総会

2016 年 10 月 8 日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中里 亮太

足場タンパク質 JSAP による細胞分裂制御機構

BMB2015

2015 年 12 月 1 日

神戸ポートアイランド(神戸市中央区)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()