

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08579

研究課題名(和文) JSAPによる細胞内輸送制御の破綻に起因する神経細胞死と染色体分配異常の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neuronal cell death and chromosome segregation errors induced by defects in JSAP-mediated intracellular transport

研究代表者

善岡 克次 (Yoshioka, Katsuji)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：60200937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：JSAPはモータータンパク質と積荷をつなぐアダプター分子として機能することが知られている。神経細胞でのJSAP機能喪失により活性化するJNK(細胞内情報伝達分子の1つ)は、軸索内で逆行性に輸送され、その結果、神経細胞死が誘導されることを明らかにした。また、分裂細胞において、JSAP発現亢進・機能喪失がもたらす染色体分配異常は、細胞内輸送制御の破綻に起因する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、軸索輸送の破綻がもたらす神経細胞死は、多くの神経変性疾患に共通の現象である可能性が示唆された。神経細胞死の鍵となる分子を同定し、それらを標的にすることによって、多くの神経変性疾患に有効な治療薬の開発につなげることができると期待される。また、細胞分裂における染色体の不安定性は、がんをはじめとする疾病と密接に関連している。本研究成果は、正確な染色体分配を保障する普遍的な分子メカニズムの解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：JSAP is known to function as an adaptor protein linking cargoes to kinesin/dynein motor proteins. We found that activated axonal JNK moves retrogradely in a dynein-dependent manner in JSAP-deficient neurons, and induces neuronal death. We also suggest that JSAP plays an important role in the regulation of intracellular transport system, and that its impairment by increased expression of JSAP or JSAP loss-of-function is likely to be causative for chromosome segregation errors in dividing cells.

研究分野：医化学一般

キーワード：細胞死 染色体 マウス 細胞分裂 足場タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

軸索輸送は神経細胞の成長と生存に不可欠であり、その障害は神経細胞死や神経変性疾患の直接の原因となる。しかし、軸索輸送制御とその破綻による神経細胞死機序については不明な点が多い。一方、分裂細胞において、娘細胞に遺伝情報を正確に伝えるためには染色体の均等分配が必須であり、その異常は細胞のがん化と深く関わっている。これまでに多くの研究が行われ、染色体の安定性を保持するための仕組みが分子レベルで明らかにされつつあるが、十分な理解には至っていない。

複数のグループの研究から、モータータンパク質（キネシン、ダイニン）と積荷をつなぐアダプター分子は、軸索輸送や細胞分裂において重要な役割を担うことが知られている。私たちのこれまでの解析から、アダプタータンパク質 JSAP はキネシン-1 に依存した軸索輸送の新規制御因子であり、JSAP 機能喪失によって軸索輸送障害に起因する神経細胞死が誘発されることが分かってきた。また、分裂細胞では、JSAP は染色体分配に関わる制御因子として機能し、JSAP 発現亢進は染色体分配異常をもたらすことが示唆される。このようなことから、JSAP は分裂・非分裂両細胞における輸送システムの鍵分子であると考えられるが、JSAP 機能異常による神経細胞死と染色体分配異常の分子メカニズムについては、ほとんど知見が得られていない。

### 2. 研究の目的

JSAP による細胞内輸送制御の破綻が、どのようにして神経細胞死及び染色体分配異常を引き起こすのか、そのメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、遺伝子改変マウスから調製した初代培養神経細胞と胚性線維芽細胞、及びヒト株化細胞を用いた実験を行なった。

(1) JSAP タンパク質 (JSAP1, JSAP2) の欠失が誘導可能な初代培養神経細胞を構築し、JSAP1, JSAP2 それぞれ単独、あるいは両者の欠失による軸索輸送障害・神経細胞死の解析を行った。

(2) JSAP タンパク質の過剰発現により誘発する染色体分配異常について、ヒト株化細胞でタイムラプス解析、免疫細胞化学的解析、及び分子細胞学的解析を行った。

(3) 上記 (1) と同様、JSAP1, 2 の欠失が誘導可能なマウス胚性線維芽細胞を用い、JSAP 欠失による染色体分配の影響について、上記 (2) と同様の手法を使って解析した。

### 4. 研究成果

(1) JSAP1, JSAP2 それぞれを単独で欠失させた神経細胞では軸索輸送障害は検出されず、両者を欠失させた場合にのみ軸索輸送障害が認められた。また、野生型 JSAP1 (あるいは JSAP2) 及びキネシン-1 結合ドメインを欠く変異型 JSAP1 (あるいは JSAP2) を用いたレスキュー実験を行ったところ、野生型 JSAP を導入すると軸索輸送障害は回復したが、変異型 JSAP では回復しなかった。さらに、JNK MAP キナーゼあるいはダイニンに対する阻害剤を用いた実験を行い、JSAP1, 2 欠失に起因する神経細胞死が JNK あるいはダイニン阻害剤によって抑制された。

このようなことから、JSAP1, 2 はキネシン-1 依存性の軸索輸送においてオーバーラップした機能を持ち、両者を欠失した神経細胞では軸索内で JNK MAP キナーゼの活性が亢進し、活性化 JNK が細胞体に逆行性輸送され、その結果、神経細胞死が誘導されると考えられる。

(2) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合 JSAP1 および JSAP2 発現ベクターを作製して HeLa 細胞に導入した。解析の結果、野生型 JSAP の強制発現により、間期では多核や小核などの核形態異常、また、分裂期 (M 期) では娘細胞への染色体分配の遅延が高頻度で起こることを見出した (図 1)。しかし、KBD を欠く変異型 JSAP では染色体分配異常は認められなかった (図 1)。

このようなことから、JSAP は染色体分配に関わる重要な因子であり、JSAP 発現亢進による染色体分配異常の誘発は、細胞内輸送制御の破綻に起因すると考えられる。

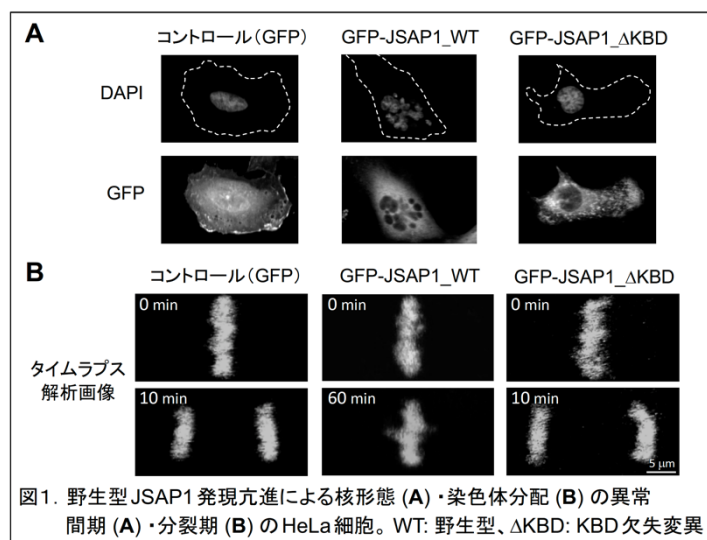


図1. 野生型 JSAP1 発現亢進による核形態 (A)・染色体分配 (B) の異常  
間期 (A)・分裂期 (B) の HeLa 細胞。WT: 野生型、ΔKBD: KBD 欠失変異

(3) 染色体標識のため、GFP 融合ヒストン H2B 発現ベクターを作製し、Cre-loxP システムにより JSAP1, 2 の欠失が誘導可能なマウス胚性線維芽細胞 (MEF) に導入した。解析の結果、JSAP1, 2 二重欠損 MEF では染色体分配の異常 (遅延染色体) が高頻度に認められる、という当初予期していない新たな知見を得た (図2)。一方、JSAP1 (あるいは JSAP2) 単独欠損 MEF は野生型 MEF と同様の表現型を示した。

また、GFP 融合 PLK1 (紡錘体チェックポイントの鍵分子の1つ) 発現ベクターを作製して、免疫染色法による解析を行った。その結果、JSAP1, 2 二重欠損 MEF の分裂期中期では、過剰な中心体と染色体近傍での PLK1 の異常な蓄積が検出された (図3)。この結果は、JSAP 機能喪失により、中心体複製や紡錘体チェックポイントの障害が誘発されることを示唆している。

このようなことから、JSAP は中心体複製や紡錘体チェックポイントの鍵分子の時空間的制御に関わる新規因子であり、染色体の安定性維持において重要な役割を担うと考えられる。

細胞分裂における染色体の均等分配は、正確な遺伝情報の伝達に必須であり、その異常はがんをはじめとする疾病と密接に関連している。本研究は、JSAP が染色体分配の新規制御因子として機能する可能性を示し、正確な染色体分配を保証する普遍的な分子機構の解明に貢献すると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 501(3): 724-730, 2018. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.055.
- ② Fukuoka M, Yoshioka K, Hohjoh H. NF- $\kappa$ B activation is an early event of changes in gene regulation for acquiring drug resistance in human adenocarcinoma PC-9 cells. *PLoS One*. 13(8): e0201796, 2018. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0201796.
- ③ Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, Nio K, Shimakami T, Shimizu R, Nakasyo S, Murai K, Shirasaki N, Okada H, Sakai Y, Sato T, Suzuki T, Yoshioka K, Kaneko S. The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication. *Sci Rep*. 8(1): 13143, 2018. 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-31421-6.
- ④ Gunarta IK, Li R, Nakazato R, Suzuki R, Boldbaatar J, Suzuki T, Yoshioka K. Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer Sci*. 108: 1602-1611, 2017. 査読有 doi: 10.1111/cas.13294.
- ⑤ Yan Q, Yang C, Fu Q, Chen Z, Liu S, Fu D, Rahman RN, Nakazato R, Yoshioka K, Kung SKP, Ding G, Wang H. Scaffold protein JLP mediates TCR-initiated CD4<sup>+</sup>T cell activation and CD154 expression. *Mol Immunol*. 87: 258-266, 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.006.
- ⑥ Espinoza JL, Nguyen VH, Ichimura H, Pham TT, Nguyen CH, Pham TV, Elbadry MI, Yoshioka K, Tanaka J, Trung LQ, Takami A, Nakao S. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human

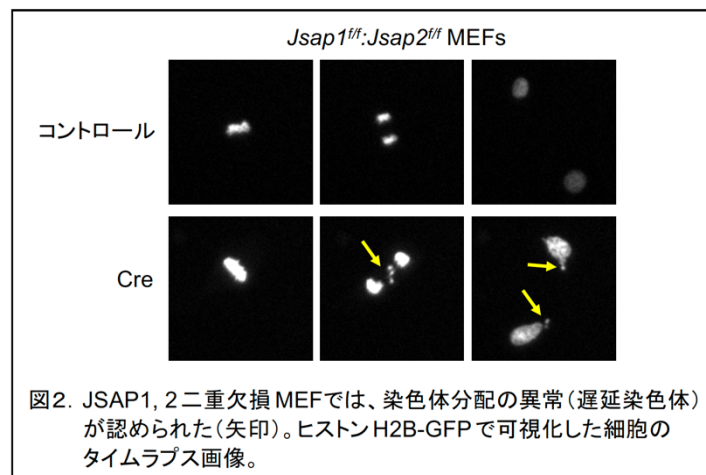


図2. JSAP1, 2二重欠損 MEFでは、染色体分配の異常 (遅延染色体) が認められた (矢印)。ヒストンH2B-GFPで可視化した細胞のタイムラプス画像。

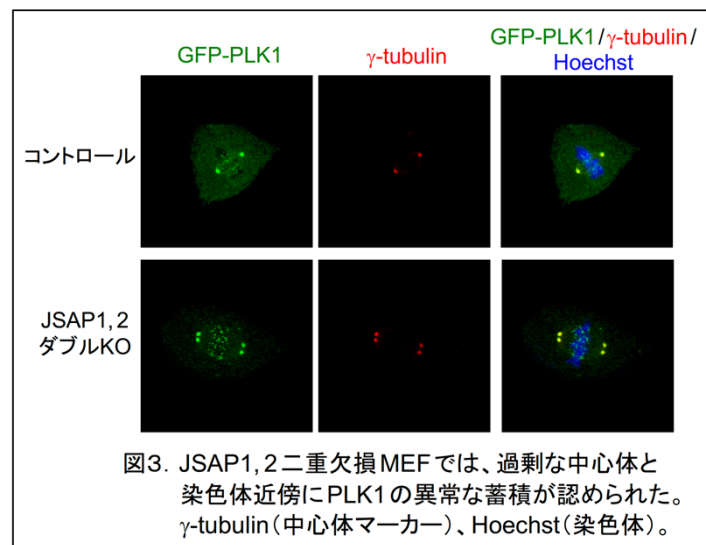


図3. JSAP1, 2二重欠損 MEFでは、過剰な中心体と染色体近傍に PLK1 の異常な蓄積が認められた。 $\gamma$ -tubulin (中心体マーカー)、Hoechst (染色体)。

Papilloma Virus-related cancers. *Sci Rep.* 6: 39231, 2016. 査読有 doi: 10.1038/srep39231.

- ⑦ Takahashi M, Fukuoka M, Yoshioka K, Hohjoh H. Neighbors' death is required for surviving human adenocarcinoma PC-9 cells in an early stage of gefitinib treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 479(2): 393-397, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.092.
- ⑧ Yoshioka K. Commentary: Critical role of JSAP1 and JLP in axonal transport in the cerebellar Purkinje cells of mice. *J Neurol Neuromedicine* 1(8): 19-21, 2016. 査読有 doi: 10.29245/2572.942X/2016/8.1095.

[学会発表] (計10件)

- ① Gunarta IK, Nakazato R, Erdenebaatar P, Boldbaatar J, Suzuki R, Yoshioka K. Functional role of JSAP in mitotic chromosome segregation. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月29日, 横浜
- ② Gunarta IK, Yoshioka K. Protective role of JLP-JNK pathway against oxidative stress-induced cell death. 第77回日本癌学会学術総会, 2018年9月28日, 大阪
- ③ Boldbaatar J, Nakazato R, Yoshioka K. Overexpression of JSAP induces chromosome segregation errors. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) 2017年12月8日, 神戸
- ④ Nakazato R, Boldbaatar J, Yuliana D, Suzuki R, Yoshioka K. Functional analysis of JSAP in the regulation of chromosome segregation. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) 2017年12月8日, 神戸
- ⑤ Gunarta IK, Li R, Yoshioka K. Role of JLP in oxidative stress-induced cell death. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) 2017年12月6日, 神戸
- ⑥ Gunarta IK, Yoshioka K. Functional role of Gli1 in maintaining mesenchymal-like and invasive phenotype of melanoma cells. 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月30日, 横浜
- ⑦ Yoshioka K, Sato T. Critical role of JSAP in axonal transport to prevent neuronal degeneration. 第60回日本神経化学会大会 シンポジウム “The signaling of JNK as a positive signal for neuronal development and regeneration” 2017年9月8日, 仙台
- ⑧ Yoshioka K. Role of scaffold protein JSAP in cancer. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Viral Hepatitis. 2016年6月28日, 中国・成都
- ⑨ Gunarta IK, Yoshioka K. Role of the Gli1 transcription factor in melanoma metastasis. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年10月7日, 横浜
- ⑩ Nakazato R, Yoshioka K. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年10月8日, 横浜

[産業財産権]

なし

[その他]

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

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名 : I Ketut Gunarta

ローマ字氏名 : I Ketut Gunarta

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。