

令和 4 年 5 月 29 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：2020～2021

課題番号：20K22803

研究課題名（和文）モーターアダプターJLPによる染色体安定性の制御機構

研究課題名（英文）Role of the adaptor protein JLP in chromosome stability

研究代表者

鈴木 隆介（Suzuki, Ryusuke）

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：70882215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで染色体異数性を誘導するメカニズムやそれを防ぐ染色体安定性の制御機構について数多くの研究がなされてきたが、その詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、モーターアダプターJLPの発現亢進が、染色体異数性を誘導することを世界で初めて見出した。また、JLP発現亢進細胞において、紡錘体形成チェックポイント構成因子MAD2の細胞分裂前中期における動原体での局在量の減少が観察された。これらの結果から、JLPは、分裂期におけるタンパク質の局在制御を通じて、染色体安定性の維持に寄与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体安定性の制御にかかわる多くのタンパク質は、細胞分裂期の適切な時期に適当な場所で機能することが知られている。本研究成果により示唆された分裂期におけるモーターアダプターによるタンパク質の局在制御機構は、未解明な部分の多い染色体安定性制御タンパク質の時空間的制御の解明に貢献すると考えられる。また、多くのがん細胞で認められる染色体異数性の誘導メカニズムの一端が明らかにされたことから、がんに対する有効な予防・治療法の発見につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Chromosome stability is tightly regulated through the cell cycle. However, its detailed molecular mechanisms remain elusive. JLP is known as an adaptor protein for kinesin/dynein motor proteins, and its overexpression has been reported in many types of cancer. In this study, we found overexpression of JLP induces aneuploidy in non-transformed human telomerase reverse transcriptase-immortalized RPE-1 cells. Furthermore, we found JLP overexpression reduces kinetochore accumulation of MAD2, one component of spindle assembly checkpoint, in prometaphase cells. These results suggest JLP plays an important role in maintenance of chromosome stability through the regulation of protein localization at mitotic phase.

研究分野：医化学

キーワード：染色体異数性 染色体安定性 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

染色体数が正常細胞と異なる異数性は、多くのがん細胞が持つ性質である。異数性により引き起こされる遺伝子のコピー数の増減は、細胞のがん化やがんの悪性を促進させる重要な因子であると考えられている。がんの予防や治療の観点から、これまで異数性を誘導するメカニズムやそれを防ぐ染色体安定性の制御機構について数多く研究がなされてきたが、その詳細については未だ十分な理解に至っていない。

本研究で着目した JLP (別名 JIP4, SPAG9) は、シグナル伝達経路の足場タンパク質やモータータンパク質 (キネシン・ダイニン) のアダプター分子として機能し、細胞内の種々の制御機構に関与していることが明らかにされている。一方で、JLP の発現亢進が様々な種類のがんで報告されており、これまでの研究でがん細胞の増殖能や浸潤能の増強に関与することが示されている。しかし、JLP の発現亢進が、正常細胞からがん細胞へと変化する過程に必要なとされるか、ということについては全く調べられてこなかった。我々は、ヒト正常二倍体不死化細胞 RPE-1 においてレンチウイルスベクターを用いた JLP タンパク質の強制発現を行い、JLP の発現亢進が異数性細胞の割合を顕著に増加させることを見出した。また、興味深いことに、キネシン (あるいはダイニン) との結合領域を欠損させた変異型 JLP を発現させた場合には、異数性の誘導は認められなかった。

このようなことから、JLP のモーターアダプターとしての機能が染色体安定性の制御において重要な役割を持つと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、染色体安定性の制御における JLP の役割解明と JLP 発現亢進による異数性の誘導メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、正常な染色体数 (46 本) を安定に維持し、染色体安定性や細胞周期制御についての研究に広く用いられているヒト正常二倍体細胞株 RPE-1 細胞を使用して実験を行った。

(1) 異数性を誘導するにあたり JLP の発現をどの程度亢進させる必要があるかを明らかにするため、転写因子結合領域を欠損させることでプロモーター活性を変化させた 3 種類の JLP 発現レンチウイルスベクターを作製した。これらを用いて JLP の発現亢進の程度が異なる細胞を作製し、中期染色体スプレッド法により染色体数の解析を行った。

(2) JLP 発現亢進が染色体安定性に与える影響を同一の遺伝的背景で解析するため、Tet-O N システムにより外来性 JLP の発現を誘導可能な細胞系を樹立した。この細胞系を用いて、染色体数の解析を行い、染色体安定性に与える影響を評価した。

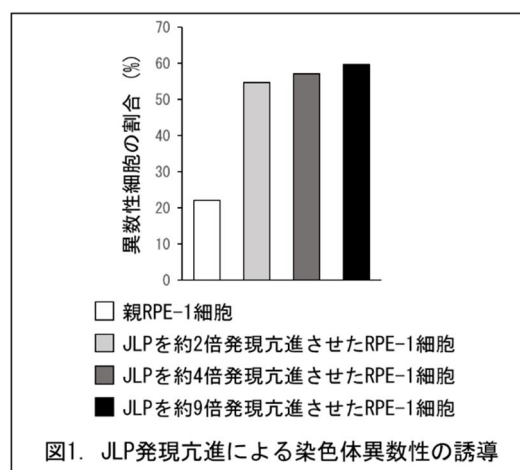
(3) JLP 発現亢進が中心体の複製や成熟に与える影響を調べる目的で、JLP 発現亢進細胞において中心体のマーカー分子である γ -チューブリンに対する免疫染色を行った。この際、チミジンおよび RO-3306 を用いた細胞周期同調を行い、細胞分裂期における中心体の数や細胞内局在について解析した。

(4) JLP 発現亢進が細胞分裂制御タンパク質の局在変化に与える影響を調べる目的で、分裂期キナーゼである PLK1 と紡錘体形成チェックポイント構成因子 (MPS1, MAD2) に着目し、これらを標的とした免疫染色を行った。上記 (3) と同様にして細胞周期同調を行い、分裂期の細胞における局在を解析した。

4. 研究成果

(1) 3 種類の JLP 発現レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、JLP の発現がそれぞれ約 2 倍、4 倍、9 倍に亢進した細胞を取得した。これらの細胞を用いて染色体数を解析したところ、全てにおいて異数性細胞の誘導が認められた (図 1)。また、異数性細胞の割合は、3 種類の JLP 発現亢進細胞の間で大きな差異は認められなかった。

このようなことから、JLP の発現亢進は、発現亢進の程度に大きな依存はせず染色体安定性に影響を与え、染色体異数性を誘導すると考えられる。



(2) ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法では、発現カセットが挿入された箇所に依りて、導入遺伝子の発現レベルが異なる、他の内在性遺伝子に損傷を与える、といった問題が生じる恐れがある。これらの可能性を排除するため、Tet-ON システムにより外来性 JLP の発現を誘導可能な発現カセットをヒトゲノムにおけるセーフハーバー部位である AAVS1 領域に CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により挿入し、JLP の発現亢進が誘導可能な RPE-1 細胞を作製した。作製した細胞をドキシサイクリンで処理し、JLP の発現を解析したところ、約 4 倍の発現亢進が認められた。ドキシサイクリン処理後 48 時間において染色体数を解析したところ、異数性細胞の割合

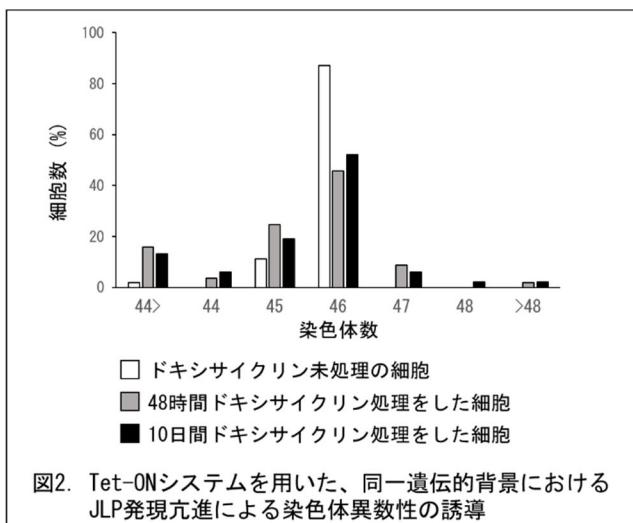


図2. Tet-ONシステムを用いた、同一遺伝的背景における JLP 発現亢進による染色体異数性の誘導

の顕著な増加が認められた (図2)。ドキシサイクリン処理を 10 日間継続させ、同様な解析を行ったところ、興味深いことに異数性細胞の割合は 48 時間処理の細胞と比較して大きな差はなく、染色体数のバリエーションに変化は認められなかった (図2)。

このような結果から、同一遺伝的背景においても JLP 発現亢進による異数性の誘導が確認された。また、異数性細胞において、異数性のさらなる進行を抑制するメカニズムが存在することが推察された。

(3) 中心体の複製異常や局在異常は、分裂中期における染色体の整列や分裂後期における均等な染色体分配を阻害し、異数性を誘導することが知られている。JLP 発現亢進による異数性の誘導が中心体における異常に起因するものか解析するため、分裂期に同調した JLP 発現亢進細胞において細胞免疫染色により中心体を可視化した。その結果、JLP 発現亢進細胞においても正常な細胞と同様に、染色体を挟んで両極に分かれた 2 つの中心体が観察された (図3)。

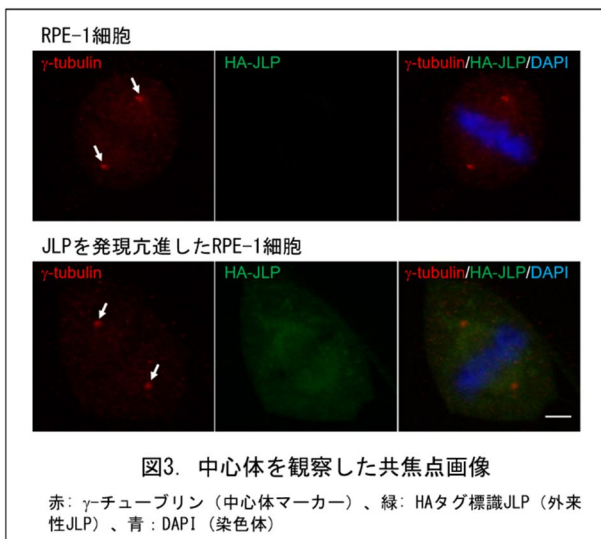


図3. 中心体を観察した共焦点画像

赤: γ -チューブリン (中心体マーカー)、緑: HAタグ標識JLP (外来性JLP)、青: DAPI (染色体)

このような結果から、JLP 発現亢進は、中心体の複製や局在に影響を与えないと考えられる。

(4) 細胞分裂期には、多様なタンパク質が時期特異的な局在を示し、それらの機能が正確な染色体分配において極めて重要であることが明らかにされている。細胞周期を同調した JLP 発現亢進細胞において PLK1, MPS1 および MAD2 について局在を解析したところ、このうち MAD2 について分裂前中期における動原体での局在量の減少が認められた (図4)。MAD2 は、紡錘糸が接着していない動原体にリクルートされ、紡錘体形成チェックポイントの活性化を介して紡錘糸の接着不全による染色体の不均等な分配を防ぐことが知られている。JLP 発現亢進による MAD2 の動原体での局在量の低下は、ノコダゾール処理により分裂期における紡錘体の形成を阻害した条件下においても観察された。

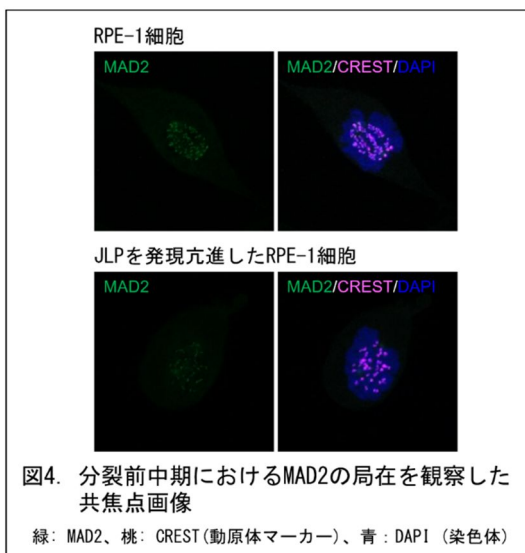


図4. 分裂前中期におけるMAD2の局在を観察した共焦点画像

緑: MAD2、桃: CREST (動原体マーカー)、青: DAPI (染色体)

このような結果から、JLP 発現亢進は、紡錘体形成チェックポイントの活性化を阻害する可能性が示された。

本研究の成果より、JLP は、細胞分裂期におけるタンパク質の時空間的制御を通じて染色体安定性の維持に寄与していることが示唆された。また、様々な種類のがんで認められている JLP の

発現亢進が、細胞のがん化を引き起こす要因の一つである染色体異数性を誘導するという発見は、新規発がんメカニズムの発見に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木隆介
2. 発表標題 Role of JLP in maintenance of chromosome stability
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木隆介
2. 発表標題 Role of the adaptor protein JSAP2 in chromosome stability
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木隆介
2. 発表標題 Effect of JLP overexpression on chromosome stability
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------