

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06818

研究課題名(和文)新規因子JSAPによる染色体安定性の維持機構

研究課題名(英文)Mechanisms of maintenance of chromosomal stability by JSAP

研究代表者

善岡 克次 (YOSHIOKA, Katsuji)

金沢大学・がん進展制御研究所・研究協力員

研究者番号：60200937

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)：JSAP1(およびJSAP2)タンパク質の過剰発現によって染色体不安定性が誘導され、細胞分裂前中期における紡錘体形成チェックポイント(SAC)因子の動原体局在量が減少することを見出した。一方、JSAP2消失細胞では、前中期におけるSAC因子の動原体局在量の増加と染色体整列異常が認められた。本研究の遂行により、JSAPは染色体安定性の維持に関わる重要な因子として、SACサイレンシングの制御に関する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、JSAPタンパク質は染色体安定性の維持に関わる重要な因子として、染色体均等分配の制御に関する可能性が明らかとなった。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、その異常はがんをはじめとする様々な疾病と密接に関連している。本研究の成果は、JSAPタンパク質ががん促進因子として働くことを示唆しており、分子標的薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that overexpression of JSAP1 (and JSAP2) induces chromosomal instability and reduces levels of spindle assembly checkpoint (SAC) components at the prometaphase kinetochore. On the other hand, in JSAP2-depleted cells, we observed increased levels of SAC components at the prometaphase kinetochore and chromosome alignment abnormalities. The results of our study revealed that JSAP proteins may be involved in the regulation of faithful chromosome segregation as an important factor in the maintenance of chromosomal stability.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体 動原体 細胞分裂 細胞増殖 足場タンパク質 染色体分配 細胞周期 ゲノム不安定性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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、その異常はがんをはじめとする様々な疾病と密接に関連している。染色体不安定性は、中心体複製や紡錘体形成チェックポイント (SAC) の異常などによって誘導される。中心体は、分裂期には、複製によって倍加した2つの中心体が主な微小管形成中心となる。また、分裂期染色体のセントロメア領域に形成される動原体と微小管の相互作用は、SAC によって監視されている。これまでの多くの研究から、染色体の均等分配機構は分子レベルで明らかにされつつある。しかし、染色体分配に関わる鍵分子の「ダイナミックな局在変化」を制御するメカニズムについては不明な点が多い。

研究代表者は、哺乳類 JNK シグナル伝達経路の新規足場タンパク質 (JSAP1 と命名) を発見後、JSAP ファミリータンパク質 [JSAP1 (別名 JIP3), JSAP2 (別名 JLP, SPAG9)] に焦点を当てた研究を展開してきた。これまでに、シグナル伝達経路の特異性規定因子としての機能に加え、JSAP1, 2 は細胞質分裂および軸索輸送において冗長的に働き、微小管依存性輸送の制御因子として重要な役割を担っていることを明らかにした。研究代表者は、さらに解析を進め、JSAP は多機能性タンパク質であり、染色体分配の制御にも関わることを示唆する予備的知見を得た。本研究を開始した当初、JSAP が染色体安定性に関与するとの報告はなかった。

2. 研究の目的

染色体分配における新規制御因子としての JSAP に焦点を当て、JSAP がどのように染色体安定性を制御しているのか、その分子機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主にヒト正常二倍体不死化 RPE-1 (hTERT RPE-1) 細胞を用いて、分子細胞生物学的手法による解析を行った。具体的には下記の通りである。

(1) ドキシサイクリン (DOX) によって JSAP1 および JSAP2 の発現が誘導可能な細胞株 (それぞれ Tet-HA-JSAP1, Tet-HA-JSAP2 と命名) を樹立し、中期染色体スプレッド法による解析を行った。

(2) 先ず、ヒストン H2B と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質 (H2B-GFP) を安定に発現する Tet-HA-JSAP2 (および Tet-HA-JSAP1) 細胞を作出した。次に、パルボシクリブ (CDK4/6 阻害剤) により細胞周期を G1/S 期に同調させ、パルボシクリブをリリースして 12 時間後からタイムラプス解析を行った。

(3) RO-3306 (CDK1 阻害剤) により Tet-HA-JSAP2 の細胞周期を G2/M 期に同調させ、RO-3306 をリリースして 15 分後に細胞を固定し、免疫細胞化学法による解析を行った。

(4) 5-Ph-IAA (オーキシンの主成分であるインドール-3-酢酸の誘導体) 添加により、標的とするタンパク質を素早く分解除去することが可能な細胞系 (改良型オーキシンドェグロンシステム) を構築して、JSAP2 の機能解析を行った。

4. 研究成果

中期染色体スプレッド法による解析を行い、野生型 JSAP2 [JSAP2 (WT)] を過剰発現した細胞では異数性が誘導されることを見出した (図 1)。野生型 JSAP1 [JSAP1 (WT)] の場合も同様に、過剰発現細胞において異数性の誘導が認められた。また、染色体を H2B-GFP で標識した、Dox 処理・未処理 Tet-HA-JSAP2 (WT) の細胞周期を G1/S 期に同調後、タイムラプス解析を行った。その結果、JSAP2 (WT) 過剰発現細胞では、異常染色体 (遅延染色体および染色体橋) が高頻度に認められ、核膜崩壊から後期開始までの時間は有意に短くなった (図 2)。さらに、Dox 処理・未処理

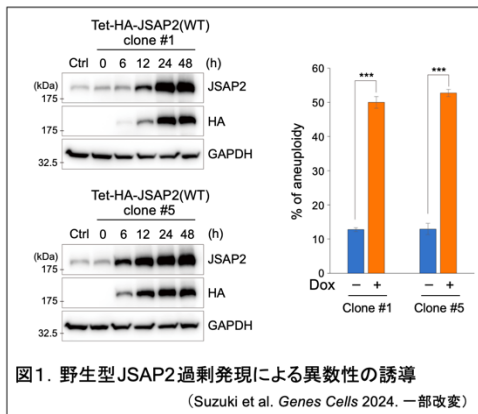


図 1. 野生型 JSAP2 過剰発現による異数性の誘導 (Suzuki et al. *Genes Cells* 2024. 一部改変)

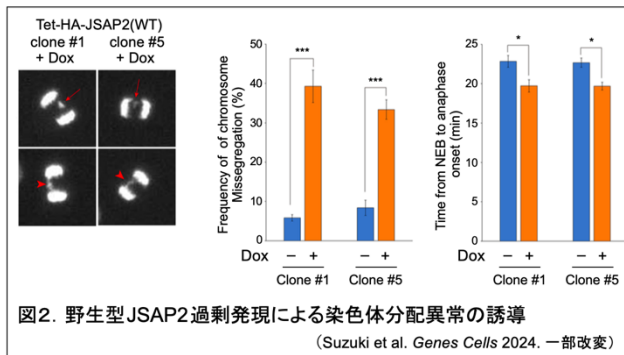
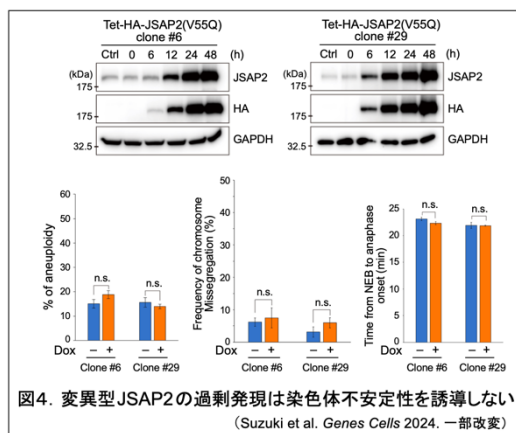
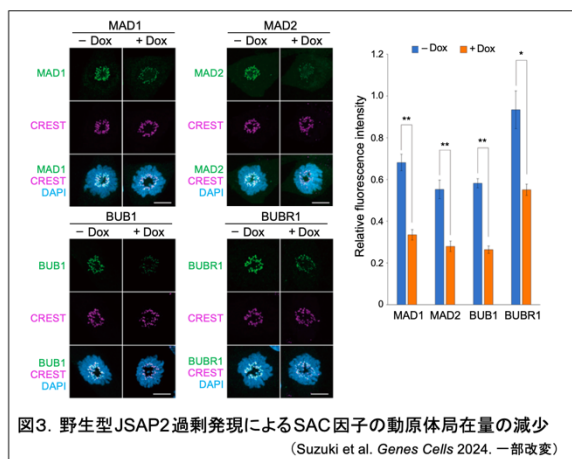


図 2. 野生型 JSAP2 過剰発現による染色体分配異常の誘導

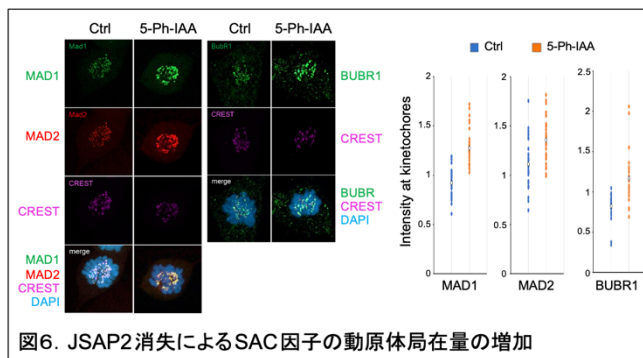
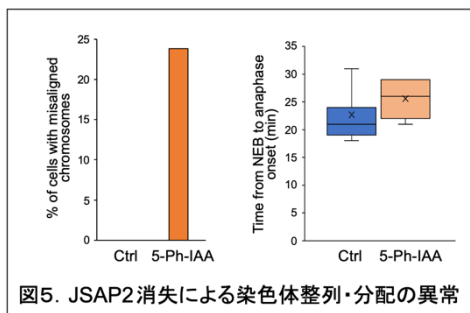
(Suzuki et al. *Genes Cells* 2024. 一部改変)

Tet-HA-JSAP2 (WT) の細胞周期を G2/M 期に同調後、SAC 因子 (MAD1, MAD2, BUB1, BUBR1) に対す

る抗体を用いて免疫細胞化学法による解析を行った。その結果、JSAP2(WT) 過剰発現により、前中期における SAC 因子の動原体局在量が減少することを見出した (図3)。一方、ダイニン軽中間鎖 1 (DLIC1) との結合能を欠く、点変異型 JSAP2 [JSAP2(V55Q)] の場合には、過剰発現による異数性の誘導および染色体分配異常は認められず、核膜崩壊から後期開始までの時間も通常通りであった (図4)。以上のことから、JSAP2 (あるいは JSAP1) の過剰発現は DLIC1 を介して染色体不安定性を誘導することが強く示唆された。



JSAP1 と JSAP2 のタンパク質発現レベルを比較検討したところ、hTERT RPE-1 細胞では JSAP1 のレベルは非常に低く、JSAP2 の約 1/10 であることが分かった。そこで、JSAP2 に注目し、改良型オーキシテグロン法を用いて M 期における JSAP2 機能喪失の影響を調べた。その結果、JSAP2 消失細胞では染色体整列異常が認められ、その整列異常細胞では核膜崩壊から後期開始までの時間は有意に長くなった (図5)。また、JSAP2 消失により、前中期における SAC 因子の動原体局在量の増加が認められた (図6)。



以上、本研究の遂行により、JSAP は染色体安定性の維持に関わる重要な因子として、SAC サイレンシングの制御に関与する可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryusuke Suzuki, Masato T Kanemaki, Takeshi Suzuki, Katsuji Yoshioka	4. 巻 29
2. 論文標題 Overexpression of JNK associated leucine zipper protein induces chromosomal instability through interaction with dynein light intermediate chain 1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 39 ~ 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4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, 鈴木 健之, 善岡 克次
2. 発表標題 JLP発現亢進による染色体不安定性の誘導
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 隆介, I Ketut Gunarta, Ravdandorj Odongoo, Purvee Erdenebaatar, 善岡 克次
2. 発表標題 Role of JLP in cell cycle progression
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

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

1. 発表者名 Gunarta IK, Odongoo R, Iwabuchi S, Hashimoto S, Yoshioka K
2. 発表標題 Role of JSAP2 in cell cycle regulation
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
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