

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15378

研究課題名（和文）染色体安定性維持におけるモーターアダプター分子JSAPの役割とその分子機構

研究課題名（英文）Role of JSAP in maintenance of chromosomal 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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：染色体安定性制御因子の細胞分裂期における時期特異的な局在が、正確な染色体分配の遂行に重要であることが示唆されている一方で、その時空間的制御については未だ十分な理解に至っていない。本研究では、モーターアダプターJSAP2発現亢進が、ダイニンとの相互作用依存的に、紡錘体形成チェックポイント構成因子の動原体での局在化を阻害し、染色体分配異常および異数性を引き起こすことを見出した。これらの結果から、JSAP2は、染色体安定性制御因子の時空間的制御を通じて染色体安定性の維持に寄与す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

分裂期の細胞における多様なタンパク質がダイナミックな局在変化が、正確な染色体分配に必要な不可欠であることが知られている。本研究では、モーターアダプターという全く新しい着眼点から染色体安定性制御因子の局在制御機構の一端を明らかにした。また、その制御異常が、細胞のがん化や腫瘍の悪性化に寄与する染色体異数性を誘導するという知見を得たことで、がんに対する有効な予防・治療法の開発に貢献することができると考える。

研究成果の概要（英文）：Spatiotemporal regulation of regulators of chromosome stability is involved in correct chromosome segregation at mitotic phase. However, its detailed molecular mechanisms remain elusive. In this study, we found overexpression of JSAP induces aneuploidy through chromosome segregation errors in non-transformed hTERT-RPE1 cells. Additionally, we observed JSAP2 overexpression promotes immature silencing of spindle assembly checkpoint (SAC) through its dynein adaptor function. This study provides a new insight into the mechanism of aneuploidy which contributes to tumor development and malignancy.

研究分野：医化学

キーワード：染色体安定性 染色体異数性 細胞分裂

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂時の染色体分配異常に起因する異数性は、細胞のがん化やがんの悪性化に寄与すると考えられており、このような事態を防ぐため、細胞分裂の各ステップは、染色体安定性制御機構により厳しく監視されている。近年の研究により、染色体安定性制御機構を構成するタンパク質(染色体安定性制御因子)が数多く同定され、それらについて理解が進められている。しかしながら、染色体安定性制御因子が、どのようにして分裂期の特定の時期に特定の場所に局在するのか、その時空間的制御については不明な点が多い。

本研究で着目した JSAP (JNK/SAPK-associated protein) は、構造的に高い相同性を示す 2 つのファミリーメンバー、JSAP1 (別名 JIP3) と JSAP2 (別名 JLP, SPAG9) からなるタンパク質ファミリーである。これらのタンパク質は、機能的冗長性を示し、シグナル伝達経路の足場タンパク質やキネシン・ダイニンモーターのアダプター分子として、細胞の様々な機能に関与することが明らかにされている。一方で、JSAP2 の発現亢進が様々ながん細胞で認められており、がん細胞の悪性形質の増強に関与することが報告されている。しかしながら、JSAP2 の発現亢進が、正常細胞からがん細胞へ変化する過程に必要とされるか、という点については全く検討されてこなかった。我々は、Cre-loxp システムにより JSAP1、JSAP2 をノックアウト (KO) させたマウス胚性線維芽細胞 (JSAP KO MEF 細胞) において、JSAP 欠失による細胞内輸送の障害が、細胞質分裂の遅延を引き起こすことを報告し、その後、JSAP KO MEF 細胞において染色体分配異常の頻度や異数性細胞の割合が増大することも見出した。さらに、JSAP2 の発現亢進が、細胞のがん化に寄与するかを検討する目的で、ヒト正常二倍体不死化 RPE-1 細胞 (hTERT-RPE1 細胞) において JSAP2 の発現亢進を試みた。その結果、JSAP2 発現亢進による異数性細胞の増加が認められた。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 JSAP2 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。また、JSAP1 についても同様な解析を行い、JSAP1 発現亢進により異数性が誘導されることを確認した。

このようなことから、モーターアダプター JSAP が細胞分裂や染色体分配において重要な役割を持ち、染色体安定性の維持に関与すると考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、JSAP による染色体安定性の制御機構とその破綻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、細胞周期や染色体分配の研究で広く使用され、正常な染色体数を安定に維持する hTERT-RPE1 細胞を用いて解析を行った。JSAP 発現亢進については、Tet-ON システムにより外來性 JSAP の発現を誘導可能な細胞系 (Tet-ON JSAP 細胞株) を樹立し、同一の遺伝的背景における比較解析を行った。

(1) JSAP 発現亢進が、異数性の主要因である染色体分配異常を誘導するかを明らかにするため、Tet-ON JSAP 細胞株において、ヒストン H2B-EGFP を用いて染色体を可視化した。この細胞株において、Palbociclib による細胞周期同調を行い、リリース後、タイムラプス装置を用いて分裂期の染色体動態の経時的な観察を行った。

(2) JSAP2 発現亢進が、染色体安定性制御因子の局在変化に与える影響を解析するため、紡錘体形成チェックポイント (SAC) に着目し、その構成因子 (MAD1, MAD2, Bub1, BubR1) を標的とした免疫染色を行った。この際、R0-3306 を用いた細胞周期同調を行い、分裂期の細胞における局在解析を行った。

(3) JSAP2 のモーターアダプター機能が、染色体安定制御においてどのような役割を持つか、その詳細を明らかにするため、ダイニン中間軽鎖 1 (DLIC1) との結合能を特異的に欠損した変異型 JSAP2 (JSAP2\_V55Q) を作製した。Tet-ON JSAP2\_V55Q 細胞株を樹立し、中期染色体スプレッド法による染色体数の解析や、上記(1)(2)と同様な解析を行い、JSAP2 のダイニンアダプター機能が、染色体安定性の制御に寄与するか、検討した。

### 4. 研究成果

(1) CDK4/6 阻害剤である Palbociclib を用いて細胞周期を G1 期に同調し、リリース後、ヒストン H2B-EGFP により標識された染色体を経時的に観察した。ドキシサイクリン (Dox) 添加により JSAP2 の発現亢進を誘導したところ、細胞分裂後期における遅延染色体の頻度の有意な上昇が認められた (図 1)。また、JSAP2 発現亢進細胞において、核膜崩壊から染色体分配の開始に至るまでの時間を定量したところ、有意な減少が認められた (図 1)。これらの結果は、JSAP1 発現亢進細胞においても同様に観察された。

このようなことから、JSAP 発現亢進は、分裂期の進行を速め、遅延染色体を含む未成熟な染色体分配を引き起こし、異数性の誘導に寄与することが示唆された。

(2) 染色体と紡錘体の適切な結合を監視する染色体安定性制御機構である SAC の不活性化は、染色体分配異常や分裂期の短縮化を引き起こすことが知られている。分裂期に同調した JSAP2 発現亢進細胞において、SAC 構成因子の局在解析を行ったところ、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2)。SAC 構成因子は、紡錘糸が接着していない動原体にリクルートされ、SAC の活性化を介して紡錘糸の接着不全による染色体分配異常を防ぐことが明らかにされている。JSAP2 発現亢進が SAC 構成因子の発現に影響を与えるかを調べる目的で、これらのタンパク質についてウェスタンブロット法により発現解析を行った。その結果、JSAP2 発現亢進細胞において SAC 構成因子の発現変化は認められなかった。

このようなことから、JSAP2 発現亢進は、SAC 構成因子の動原体での局在化を阻害し、SAC 活性の抑制を引き起こすことが示唆された。

(3) SAC 構成因子がダイニンモーター依存的に動原体より除去されることにより、SAC 不活性化が誘導されることが報告されている。近年の研究により、JSAP2 において、ダイニンモーターの構成要素である DLIC1 との相互作用を特異的に欠損させた JSAP2\_V55Q 変異体が報告され、JSAP2 のダイニンアダプター機能に焦点を当てた解析が可能となった。Tet-ON JSAP2\_V55Q 細胞を作製し、中期染色体スプレッド法により染色体数を解析したところ、JSAP2\_V55Q 強制発現は、異数性を誘導しなかった(図3)。また、分裂期の染色体動態や SAC 構成因子の動原体での局在量についても、JSAP2\_V55Q 強制発現による顕著な変化は認められなかった(図3)。

このようなことから、JSAP2 発現亢進により誘導される染色体安定性の制御異常は、JLP のダイニンモーターアダプター機能に依存していることが示唆された。

本研究により、JSAP の発現亢進は、染色体分配異常を引き起こし、異数性を誘導することが示された。特に、多くのがん細胞で認められる JSAP2 発現亢進は、ダイニンモーターアダプター

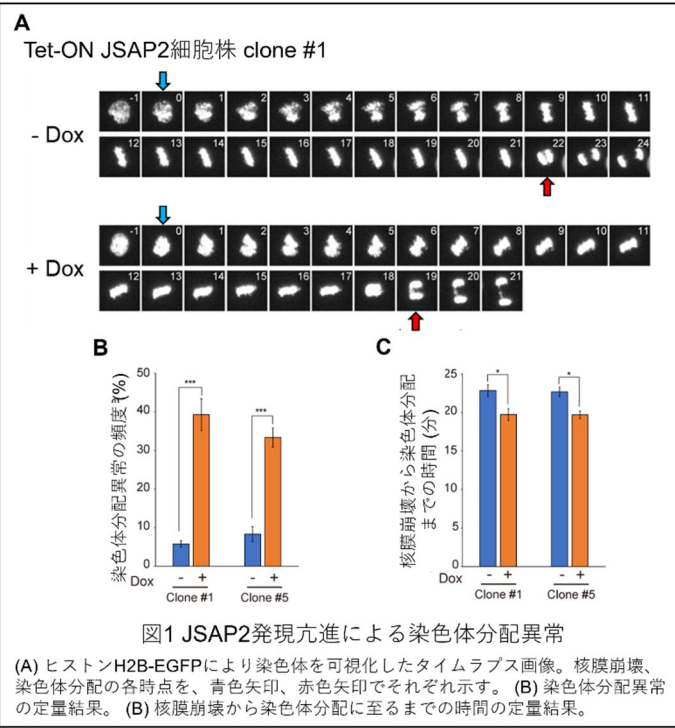


図1 JSAP2発現亢進による染色体分配異常

(A) ヒストンH2B-EGFPにより染色体を可視化したタイムラプス画像。核膜崩壊、染色体分配の各時点、青色矢印、赤色矢印でそれぞれ示す。(B) 染色体分配異常の定量結果。(C) 核膜崩壊から染色体分配に至るまでの時間の定量結果。

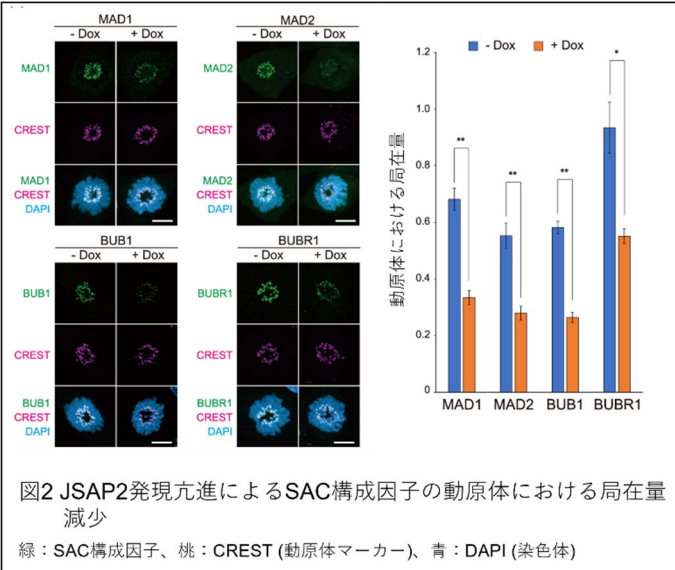


図2 JSAP2発現亢進によるSAC構成因子の動原体における局在量減少

緑：SAC構成因子、桃：CREST (動原体マーカー)、青：DAPI (染色体)

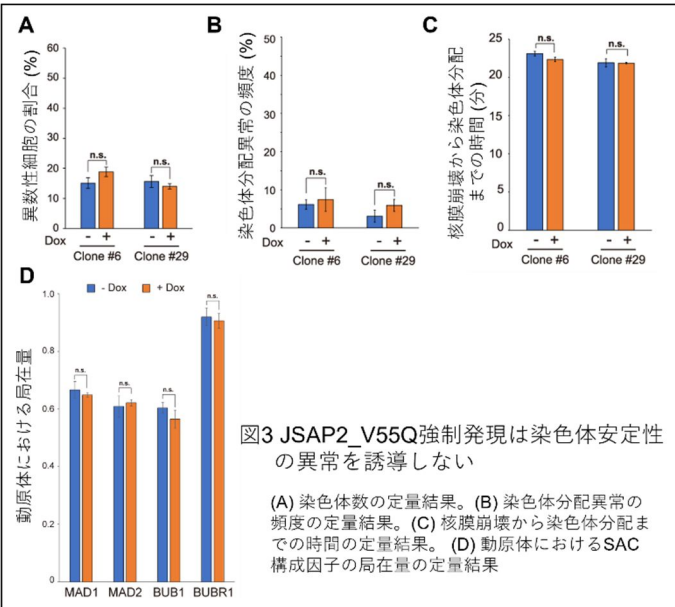


図3 JSAP2\_V55Q強制発現は染色体安定性の異常を誘導しない

(A) 染色体数の定量結果。(B) 染色体分配異常の頻度の定量結果。(C) 核膜崩壊から染色体分配までの時間の定量結果。(D) 動原体におけるSAC構成因子の局在量の定量結果

機能依存的に SAC を早期に不活性化し、不完全な染色体分配を引き起こし、異数性細胞の形成に寄与することが示された。細胞のがん化やがんの悪性化に寄与と考えられている異数性の誘導メカニズムの一端を解明した本研究成果は、新規のがんの予防法や治療法の開発に貢献できると期待される。

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 Suzuki Ryusuke, Kanemaki Masato T., Suzuki Takeshi, Yoshioka Katsuji	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 2023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2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, I Ketut Gunarta, Ravdandorj Odongoo, Purvee Erdenebaatar, 善岡 克次
2. 発表標題 Role for JLP in cell cycle progression
3. 学会等名 第45回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、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 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------