

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791987

研究課題名(和文) 分裂期タウの染色体安定化機能とカタニン

研究課題名(英文) Tau contributes to the precise segregation of chromosomes by regulating katanin

研究代表者

須藤 遙 (Haruka, Sudo)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：20372980

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)：カタニンに類似した蛋白(以下カタニン)とタウに関し、1)カタニン乳癌変異体の過剰発現はRFL6細胞を形質転換した。微小管感受性試験においてタウが、カタニンによる微小管切断を抑制した。2)形質転換と相関し染色体分配異常、微小核形成を検出した。3)正常乳腺細胞にタウは発現し、紡錘体に局在した。4)同細胞で、タウを機能阻害すると、カタニン依存性にa)動原体微小管が減少、b)染色体分配異常、c)微小核形成した。5)同条件で単離した紡錘体は、物理的な強度が低下した。6)同条件で、染色体の微小管結合が阻害された。7)同条件で、染色体異常性が惹起された。従って、タウの染色体安定性への寄与が裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：Regarding katanin-like (KL) and tau, I obtained data: 1) Human breast cancer derived mutant KL expressing RFL6 rat fibroblasts showed significant transformation, which was suppressed by expression of tau. In RFL6 cells, KL-induced loss of microtubules was inhibited by tau. 2) Exogenously KL expressing RFL6 cells showed chromosome missegregation and micronuclei formation. 3) In primary human mammary epithelial cells (HMECs), both endogenous tau and KL proteins localized on mitotic spindles. 4) Tau-knocked down(kd) HMECs showed a) alterations in kinetochore fibers, b) missegregation of chromosomes, and c) formation of micronuclei, some of which were inhibited by KL knockdown. 5) The isolated mitotic spindles from tau-kd HMECs showed physical fragility. 6) Tau-kd HMECs showed a) disconnected chromosomes to spindles and b) aneuploidy under p53 knockdown. These data support the hypothesis that tau contributes to precise chromosome segregation via inhibition of microtubule severing by KL.

研究分野：腫瘍

キーワード：染色体不安定性 タウ 乳癌 微小管切断 紡錘体

1. 研究開始当初の背景

微小管関連蛋白タウは神経細胞に発現し、ヒト神経疾患において過リン酸化されることが知られている。我々は神経疾患に関連したリン酸化に伴うタウの機能変化を解析する過程において、過リン酸化タウが微小管切断蛋白カタニンに対し抑制能を保持することを見出した。一方、分裂能を持つ細胞にもタウを発現しているものがあり、分裂期にタウは過リン酸化される。近年、正常乳腺、口腔粘膜、唾液腺上皮細胞はタウを発現しており、タウ蛋白の発現低下が癌化につながる事が判明してきた。

2. 研究の目的

動物細胞分裂期紡錘体の主要構成要素は微小管であり、その主たる役割は染色体の娘細胞への正確な均等分配である。その異常は染色体不安定性の原因となり癌進展の原動力のひとつとして考えられている。乳癌・口腔癌・唾液腺腫瘍においてもその大半において染色体不安定性がみとめられ、これに伴う遺伝子発現プロファイルの変化がその悪性度に大きく寄与すると考えられている。従って、染色体の質的あるいは数的な不安定性をもたらすメカニズムを解明し、これを抑制する手段を開発することは癌を含む多くの悪性腫瘍の進展をくいとめる治療を開発するうえで極めて大切である。

カタニンは微小管を切断する蛋白であり、分裂期紡錘体上に局在し紡錘体形成に寄与すると言われている。

タウの生理機能は神経細胞において長年解析され、これまでに主として微小管安定化、微小管束化(微小管の側方結合)などに働くことが明らかにされている。これらに加えて近年、タウはカタニンの微小管切断を抑制することが報告された。この抑制は微小管結合ドメイン(MTBD)に依存する。MTBDを持つ他の微小管関連蛋白もこの抑制能をもつ。

一方、アルツハイマー病においてタウが過リン酸化されることが広く知られ、過リン酸化されたタウは微小管に対する結合能が低下すると考えられている。しかし、我々はアルツハイマー病に関連した擬似過リン酸化変異体タウがカタニン抑制活性を持つことを見出した。

タウは分裂する細胞にも発現し、分裂期には特定のパターンでリン酸化され、カタニンと同様に紡錘体上に局在する。

紡錘体上のタウの機能は不明であるが、タウ遺伝子に突然変異をもつ、神経変性疾患患者由来の細胞において、染色体不安定性が報告されている。さらにタウノックアウトマウス由来の細胞においても染色体不安定性が報告されている。

これらは紡錘体上のタウが染色体の正確な分配に貢献していることを示唆する。しかし、紡錘体上のタウの微小管への効果に関する研究は皆無といってよい。

腫瘍の分野では最初、タウは微小管を標的とするタキサン系抗がん剤の微小管結合を阻害するため、薬物に感受性の低い患者をあらかじめ知るためのマーカーであると考えられ注目された。しかし最近の臨床研究の結果、逆に、タウの発現低下と癌進展・予後不良が正に相関することが報告されている。

そこで我々は「タウがカタニンを抑制することにより紡錘体の微小管を保護し、正確な染色体分配を保証している」という仮説を立てた。タウの減少はカタニンの相対的活性上昇、紡錘体微小管の異常切断(微細損傷)、両極と染色体の連結性遮断、染色体分配異常、染色体の不安定性を生じ、より悪性度の高いクローンが発生する速度が高まると考えられる。

我々は、神経細胞において NAP という 8 アミノ酸の細胞膜透過性ペプチドがカタニンを抑制することを明らかにした。従って、NAP はタウの低下した紡錘体をカタニンから保護することも期待できる。

紡錘体でのタウの微小管保護作用の機序として、直接的、間接的なもののふたつが考えられる。前者は微小管に結合したタウが、カタニンの微小管切断を立体的に阻害するものである。この作用は NAP で代替可能である。一方、後者は異なる微小管上のタウが、サイドアーム(タウの N 端半分の部分)により二量体を形成することによる。

微小管の側方結合は動原体-紡錘体極をつなぐ微小管に存在し、一本の微小管がカタニンにより切断されても、結合した別の微小管によって極と染色体の連結性が保たれる。

NAP には側方結合の作用は報告されておらず、間接効果は期待できない。従って、NAP を応用した治療戦略を考えていくためには、タウの直接、間接機序の寄与度を知ることは重要である。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌組織由来タンパクサンプルの免疫学的解析。(2) ラット線維芽細胞を用いた形質転換法。(3) 同細胞で生物学的指標の解析。(4) ヒト正常乳腺上皮細胞を用いて、(5) 分裂期の生理的状況を生化学的手法、免疫染色による解析。(6) タウ、カタニン様タンパクの機能阻害実験。(7) 紡錘体単離法、(8) 染色体解析、などの方法を用いた。

4. 研究成果

カタニン様蛋白(以下“カタニン”)とタウの関係に焦点をおき、以下のような成果を得た。

(1) ヒト乳癌サンプルのタンパク定量解析において、50%を越える症例でカタニン/タウ比の上昇をきたすことを見出した。

(2) ラット線維芽細胞を用いた形質転換実験において、野生型カタニン過剰発現およびその乳癌変異体は有意な形質転換能を持つことを認めた。

(3) ラット線維芽細胞における微小管感受性試験において、分裂期型擬似リン酸化タウを含めた種々のタウ亜種が、カタニンによる微小管切断を抑制することを確認した。また、タウのN末端組換えタンパク複数個を線維芽細胞で発現・スクリーニングし、野生型タウによる微小管束形成を阻害するインヒビターを同定した。

(4) ラット線維芽細胞にカタニンを導入する系で、がん化に伴う細胞増殖、細胞死頻度、紡錘体の形態解析、分裂期染色体分配異常、微小核形成、についてそれぞれ解析した。その結果、主として分裂後期の微細な異常から染色体の異数性を惹起しているらしいことをつきとめた。

(5) 正常乳腺上皮細胞においてタウの発現、バリエーションおよびリン酸化フォームの解析、紡錘体への局在、キネトコアファイバーへの局在について調べ、詳細なタウの生理的発現状況を解析した。

(6) 乳腺上皮細胞で、タウをノックダウンする、あるいは束化抑制能をもつタウN末端断片の発現すると、a)キネトコアファイバー形成が阻害、b)染色体分配異常、c)微小核形成、をきたすことを明らかにし、これらがカタニン依存性であることを立証した。また、NAPは微小核形成を有意に阻害した。

(7) タウをノックダウンした乳腺細胞より単離した紡錘体は、物理的な強度が低下していることを単離紡錘体実験により発見した。また、NAPはこれを回復した。

(8) タウをノックダウンした乳腺細胞では、モノストロールによる単極紡錘体解析において、染色体の微小管結合が有意に阻害されていること、すなわち染色体を紡錘体極につなぐ微小管が分断されていることを見出した。また、NAPはこの分断を抑制した。

(9) P53とタウを同時ノックダウンした乳腺細胞での染色体解析実験を行い、異数体の出現を検出した。

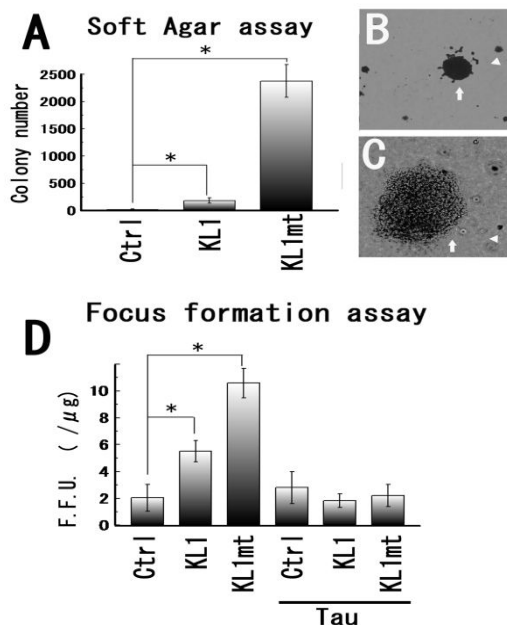


図 ラット線維芽細胞のカタニンライク1 (KL1) による形質転換とタウによる抑制 A. 安定発現細胞の軟毒天培養 BとC. 野生型(B)、乳癌由来変異体(C) KL1による軟毒天中のコロニー D. タウ安定発現細胞におけるフォーカスアッセイ 図中矢印: コロニー, 矢頭: 単独の細胞

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 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 須藤遥 (SUDO Haruka)
日本歯科大学 生命歯学部 講師
研究者番号：20372980

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：