

物質・生物機能科学専攻

微小管結合タンパク質 human Orbit に関する研究

青 沼 美 樹 (指導教員 松影昭夫)

【目的】細胞増殖には3つのステップ、DNAの複製、分配及び細胞質分裂が重要である。染色体の分配には紡錘体微小管による、染色体分離のプロセスが中心である。ここで、染色体が正確に分配されないと染色体数が異常になり細胞死やがん化につながるため細胞分裂時における正常な染色体分配は全ての真核生物にとって非常に重要な機能である。紡錘体極から微小管が伸長することで紡錘体が形成され、動原体に紡錘体微小管の一部が結合し、複製された染色体は両極に向かって引っ張られ、染色体が分配される。しかしながら、微小管と作用する因子について動物細胞では不明な点も多い。ショウジョウバエにおいて、染色体分配異常を示す変異の原因遺伝子の一つである *orbit* が井上、松影らによって見出された。この遺伝子は、165kDa の新規の微小管結合タンパク質 (MAP), Orbit をコードする。Orbit は有糸分裂期を通じて微小管に分布し、さらに Orbit 変異体では中心体の分離が阻害され、単極性の有糸分裂紡錘体を形成するために染色体分配が阻害されることが明らかにされた。ヒトでは2種類の Orbit と相同性の高いアミノ酸配列を示すゲノム断片, KIAA0622 及び KIAA0627 が得られており、我々はそれぞれがコードされるタンパク質を h(human)Orbit1 及び hOrbit2 と名付けている。

【方法】hOrbit1 及び hOrbit2 N 端断片の細胞内局在を調べるために作成された GFP-hOrbit1 及び GFP-hOrbit2 発現プラスミドを用いて、それぞれの細胞内局在及び両者を比較し解析した。さらに GFP-hOrbit1 発現細胞に関して透過電子顕微鏡による超微構造学的解析を行った。一方、GFP-hOrbit1 を発現した細胞は細胞死が誘導されることが分かっており、これらについても解析を行った。また、hOrbit1 及び hOrbit2 に対する RNAi による解析も行い、内在性の hOrbit1 及び hOrbit2 の発現が抑制された場合の形態変化を調べた。

【結果・考察】GFP-hOrbit1 及び GFP-hOrbit2 を Tet-off 発現系をもつ HeLa 細胞に導入し局在を観察したところ、両者とも微小管に結合し、繊維状の構造を示した。ところが GFP-hOrbit1 は主に核周辺の微小管に結合したが、GFP-hOrbit2 は核及び細胞質に広がる微小管にも結合していた。GFP-hOrbit1 発現すると、微小管が束化することが透過電子顕微鏡による解析で明らかになった。また、細胞死が誘導された細胞を透過電子顕微鏡で観察したところ、断片化した核と核の間に束化した微小管が入り込んでいた。これは、hOrbit1 の N 端断片が発現することで微小管が過剰に架橋され、束化が起こり核が断片化すると考えられる。さらに RNAi によって hOrbit の発現を抑制すると細胞の形は丸くなり、繊維状の微小管が見られなくなった。このような変化はチューブリンの重合阻害剤である vincristin 存在下で培養した細胞と類似していたので、hOrbit の発現が、チューブリンの正常な重合に関わっていると結論される。