2P153

突起領域に依存した MAP4 の微小管結合の協同性の定量的解析

○藤井 真人¹、久永 真市²、宝谷 紘一³、伊藤 知彦¹ (¹ 名大・院理・生命理学、² 都立大・院理・生物、³ JST)

MAP2, tau, MAP4 を主要なメンバーとする熱耐性 MAPs は、個々の微小管 (MT) の重合速度を上げると共に脱重合を停止させて MT を安定化する因子である。これらは共通して C 末端側の MT 結合領域と N 末端側の MT に直接結合しない突起領域に分けられる構造を持つ。MAP2 では、MT 上のクラスターと呼ばれる高密度に結合する領域でのみ脱重合が止まる。平衡論的解析から、全長の MAP 2 で見られる結合の正の協同性が、突起領域を欠失した変異体では見られなくなることが報告されている。これらのことから、MAP2 では突起領域が結合の協同性の制御を通して、MT 上での脱重合停止部位の決定に関与していることが示唆される。一方 MAP4 の場合、突起領域の不完全な変異体 (PJ2) では、全長のものと比べて脱重合距離が極端に短くなることが見出された。また MT 上への結合分布も PJ2 は MAP4 よりも不均一になるという結果が示されている。これらのことから MAP4 の突起領域は MAP2 と同様に結合の協同性に関与し、これを通して動的不安定性に関わっていると考えられる。

本研究では MAP4 の突起領域の MT 結合の協同性への関与を詳細に調べる目的で、蛍光ラベルした MAP4 及び PJ2 の MT 上での分布の濃度依存性を共焦点顕微鏡を用いて解析した。個々の MT の平均輝度は MAP4 では濃度に伴って緩やかに上昇したのに対して、PJ2 ではある濃度以上で急激に上昇した。またこの平均輝度の上昇に対応して、個々の MT 上に輝度の高い点、すなわち PJ2 のクラスターが形成されるという結果が得られた。この濃度に依存した結合量の上昇とクラスター形成は、MT 上への PJ2 の結合に協同性があることを示唆する。以上の結果を踏まえると MAP4 では突起領域が協同的な結合に対して抑制的に作用している可能性が考えられる。

M. Fujii, S. Hisanaga, H. Hotani, T. J. Itoh : The projection domain of MAP4 participate in the cooperative binding to microtubule

2P155

ウニ卵細胞質分裂における収縮環位置決め問題の理論モデルによる研究

○吉垣 知能 (日大 松戸歯学 生理)

動物細胞の細胞質分裂では、収縮環の位置は、分裂後期の分裂装置によって決定されるが、その分子機構については、分裂装置の微小管が関与する可能性が高いこと以外は、よく分かっていない。収縮環は、通常、分裂面が、二つの星状体を結ぶ線分の中点を垂直に横切るように形成される。しかし、ウニ受精卵を使った実験から、細胞を変形したり、分裂装置の位置を変えると、収縮環と分裂装置が通常とは異なる様々な位置関係を取ることが判明している。そこで、これら様々なケースについて、細胞表面の各点に到達する星状体微小管の予想本数を、コンピューターで計算したところ、微小管の本数密度関数 f の二次微分が正の大きな値を取る位置に、収縮環が形成されることを見出した [Yoshigaki, T., *J. theor. Biol.* (1999) **196**, 211-224]。このことは、次のような性質を持ったタンパク質が細胞膜上に存在する可能性を示している。その膜タンパク質は、(1) 関数 f の勾配に沿って、微小管の高密度領域から低密度領域に動く、(2) Fick の法則に従った並進拡散運動を行う。細胞表面の各点におけるその膜タンパク質の濃度を C とすると、(3) 関数 C が大きいほど、その場所における収縮環の形成確率は大きくなる。これらの性質から、 f と C の関係を表す微分方程式が得られ、それを解くことによって、収縮環と分裂装置の様々な位置関係を説明出来ることが判明した [Yoshigaki, T., *J. theor. Biol.* (2003) **221**, 229-244]。

T. Yoshigaki : Theoretical approach to the mechanism by which the mitotic apparatus determines the position of the contractile ring in sea urchin eggs

2P154

The projection domain dependent modification of the activities of the heat-stable MAPs on the microtubule dynamics.

○ベルマナ ソフィ¹、久永 真市²、森田 鉄兵¹、宝谷 紘一³、伊藤 知彦¹ (¹ 名大院・理・生命理学、² 都立大院・理・生物、³ CREST, JST)

Microtubule (MT) shows a characteristic behavior, "dynamics instability," the reversible and repeatable transitions between polymerization and depolymerization phases. The heat-stable MAPs including MAP2, MAP4 or tau are known to regulate the dynamic instability by stabilizing MT against depolymerization. They are composed of the N-terminal projection (PJ) domain, which does not directly bind to the MT, and the C-terminal microtubule-binding (MTB) domain. We have examined the roles of the PJ domain of MAP4 on the dynamic instability of MTs by dark-field microscopy, and found that the distances of polymerization and depolymerization phases of single MTs significantly decreased by deletion of the PJ domain. This attenuation of dynamic instability suggests that the PJ domain participates in the regulation of microtubule dynamics as well as the MTB domain. The attenuation may be due to the shortened PJ domain and/or the imperfect PJ domain. To judge these possibilities, we constructed a hybrid MAP, 2cP4B, which consisted of the MTB domain of MAP4 and the PJ domain of MAP2c, whose PJ domain is short but intact. The distances of polymerization and depolymerization phases obviously decreased in the presence of 2cP4B as the PJ domain deletion mutants. In addition, the binding ratios of both the hybrid and the intact MAP2c to MTs were two-fold higher than that of wtMAP4. These results indicate that the short PJ domain is sufficient to modify the activities of MAP4 for MT-binding and MT dynamics, which are derived from the MTB domain.

S. Permana, S. Hisanaga, T. Morita, H. Hotani, and T. J. Itoh : The projection domain dependent modification of the activities of the heat-stable MAPs on the microtubule dynamics.

2P156

神経成長円錐における lasp ファミリータンパク質と fascin の分布

○中川 裕之¹、田口 冴子¹、寺崎 朝子²、大橋 一世³、宮本 茂昭¹ (¹ 九工大・情報工・生命、² 千葉大院・自然科学・地球生命圏、³ 千葉大・理・生物)

The LIM and SH3 domain containing-protein 1, lasp-1, has been reported to localise mainly to the focal adhesion and membrane ruffle. Lasp-1 binds to F-actin via the tandem nebulin repeats at the centre of the molecule. Recently we identified a novel lasp family protein, lasp-2, as a F-actin binding protein (Terasaki et al., 2004). Although lasp-1 is expressed ubiquitously, lasp-2 specifically in brain. In the neuronal growth cone, both isoforms are concentrated to the F-actin bundle of filopodium and the edge of lamellipodium. Another F-actin binding protein, fascin, is known to concentrate in filopodia of the growth cone. To clarify the role of these F-actin binding proteins, we compared their localisation in the neuroblastoma cell line NG108-15. In the growth cone, they were concentrated to the F-actin bundles of filopodia. Although fascin was localised mainly to filopodia, lasp-1 and lasp-2 molecules were distributed over F-actin meshwork in lamellipodia in addition to filopodia. The fluorescence intensity profile of EYFP-lasp-2 was similar to that of ECFP-actin along the F-actin bundle, but the peak of lasp-1 fluorescence was located distally to that of actin. The double-transfection of ECFP-lasp-1 and EYFP-lasp-2 revealed that the lasp-1 distribution was biased to the tips of filopodium and lamellipodium than lasp-2 during a growth cone locomotion. These results indicate that lasp-1 may play a role in the initiation of actin filament bundling at lamellipodium edge followed by the stabilisation with lasp-2 and fascin.

H. Nakagawa, S. Taguchi, A. G. Terasaki, K. Ohashi and S. Miyamoto : F-actin binding proteins, lasp-1, lasp-2, and fascin show different localisation in the neuronal growth cone