The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Phosphorylation of RanGAP1 Stabilizes Its Interaction with Ran and RanBP1
Author(s)	武田, 英里
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46245
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【45】

氏　　名	武田英里（たけだえり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　19918　号
学位授与年月日	平成18年2月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Phosphorylation of RanGAP1 Stabilizes Its Interaction with Ran and RanBP1 （RanGAP1のリン酸化はRanGAP1とRanならびにRanBP1と相互作用を安定化する）
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　田中亀代次　　教　授　近藤　寿人

論文内容の要旨

〔　背景ならびに目的　〕

低分子量GTPase、Ranは、核ー細胞質間輸送に機能する重要な因子である。タンパク質やRNAなどの輸送基質は、GTP結合型のRan（RanGTP）に結合する輸送担体と結合し、細胞質から核、或いは核から細胞質へと運ばれる。RanのGTPase活性化（GAP活性）因子RanGAP1は細胞質に、GDP-GTP交換促進因子RCC1（RanGEF）が核内に、それぞれ偏在するため、RanGTPは核内に、RanGDP型Ran（RanGDP）は細胞質に多く存在し、輸送物質の方向性を保証していると考えられている。また、Ranは核輸送のみならず、細胞周期の進行や細胞分裂後の核膜の再構成など様々な核機能に関与する。

近年、RanGAP1が細胞分裂期特異的にリン酸化されて、その局在が核膜崩壊後も制御されていることが報告され、RanGTPの勾配が分裂期においても調節されていることが示唆されている。しかし、これまでに報告されているSUMO1修飾も含めて、RanGAP1への翻訳後修飾が、RanのGAP活性を調節するかどうかは報告されていない。

我々は、Ranサイクルの調節機構を研究する過程で、RanGAP1が非同調の細胞内で強くリン酸化される事を発見した。そこで、私は、このリン酸化がRanシステムにどのような影響を与えるのかを解明することを目的として研究を行った。

〔　方法ならびに結果　〕

私は、先ず、RanGAP1が試験管内*in vitro*反応系において、細胞質粗抽出液で強くリン酸化される事を見出した。更に、培養細胞内にFLAGタグ付RanGAP1を発現させ精製したところ、高い効率でリン酸化されている事が分かった。そこで、精製したFLAG-RanGAP1ならびにFLAG-RanGAP1のミュータントを使って、peptide mass finger printing法によりリン酸化部位の同定を試みた。その結果、358位のセリン残基（S^{358}）のみが効率よくリン酸化されている事が分かった。S^{358}の周辺の配列は、カゼインキナーゼII（CK2）リン酸化モチーフだったので、CK2特異的阻害剤を用いてリン酸化実験を行ったところ、RanGAP1は*in vitro*、*in vivo*でRanGAP1のリン酸化が阻害された。また、S^{358}は精製CK2で実際にリン酸化された。以上のことから、RanGAP1のS^{358}はCK2によって、リン酸

化される事が強く示唆された。また、データーベース検索により、今回同定したRanGAP1のCK2リン酸化部位は、酵母から哺乳類までよく保存されていることも分かった。

次に、S^{358}のリン酸化状態を認識する抗体anti-pS358と、非リン酸化状態を認識する抗体anti-S358を作製し、HeLa細胞の内在性RanGAP1について、ウェスタンブロット法でRanGAP1の存在様式を確認した。その結果、内在性RanGAP1はそのほとんどがS^{358}にリン酸化を受けていること、SUMO1修飾されているRanGAP1の一部はリン酸化されていないことが分かった。

次に、S^{358}のリン酸化がRanGAP1の機能にどの様な影響を与えるかを検討した。その結果、リン酸化はRanGAP1の核膜への局在に必要と考えられているSUMO1修飾効率にも、GAP活性にも大きな影響を与えないことが分かった。しかし、興味深いことに、ヒト培養細胞にFLAG-RanGAP1を一時的に発現後精製すると、リン酸化したFLAG-RanGAP1には、内在性のRanと、RanGAP1のコアクチベーターであるRanBP1が共沈降することがわかった。S^{358}をアラニンに置換したミュータントでは、ほとんどRanとRanBP1は共沈降しなかった。このことからRanGAP1のS^{358}のリン酸化は、RanGAP1とRanならびにRanBP1との3者の結合を安定化させることにより、Ranサイクルを調節し、Ranを介した核－細胞質間物質輸送の調節を行っている可能性が示唆された。

〔 総　　括 〕

Ranの核－細胞質間物質輸送の調節機構を探る過程で、私はRanGAP1のS^{358}が非常に効率よくリン酸化される事を突き止めた。このリン酸化部位は、酵母から哺乳類まで良く保存されていた。また、細胞内でRanGAP1はほとんどがS^{358}にリン酸化を受けていたが、SUMO1修飾されたRanGAP1の一部がリン酸化されていないことが分かった。しかし、S^{358}のリン酸化はSUMO1修飾には影響を与えないこと、さらにはGAP活性にも影響を与えないことが分かった。しかし、興味深いことに、細胞内ではS^{358}のリン酸化によってRanGAP1は、RanならびにRanBP1と安定に結合するという結果が得られた。このことから、RanGAP1は、S^{358}がリン酸化を受けることにより、Ran、RanBP1との結合性が制御され、最終的には、Ranを介した核－細胞質間物質輸送の調節を行っていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者は、真核細胞の核－細胞質間輸送を研究する上で、輸送の方向性を決定する重要な因子である低分子量GTPase Ranの、GTPase活性化因子であるRanGAP1が、細胞内で強くリン酸化される事を見出した。そこで、RanGAP1のリン酸化部位と、その特異的なキナーゼを同定した。内在性のRanGAP1は、ほとんどがリン酸化されていたが、RanGAP1のリン酸化は細胞内局在や自身のGAP活性に顕著な影響を与えなかった。ところが、リン酸化されたRanGAP1は、RanとGAP活性のコアクチベーターであるRanBP1と安定な三者複合体を*in vivo*で形成していることを突き止めた。申請者は、リン酸化型RanGAP1が、*in vivo*でRanのサイクルを制御すると考えていて、これまで未知だったRanを介した輸送機構の制御機構の解明の糸口となる結果を得ており、博士（医学）の学位授与に値すると判断した。