

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46245">https://hdl.handle.net/11094/46245</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	武田英里
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-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、まず、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 fingerprinting 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<sup>358</sup>) のみが効率よくリン酸化されている事が分かった。S<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> のリン酸化が RanGAP1 の機能にどのよう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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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<sup>358</sup> 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。