

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 包 迎春

MgcRacGAP は細胞の増殖、分化に関与する分子と考えられている。MgcRacGAP は HeLa 細胞のような付着細胞の場合、interphase では主に核内に局在する。本研究は MgcRacGAP の核移行に関わる分子メカニズムについて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. MgcRacGAP のさまざまな欠失型変異体の細胞内における局在を検討した実験から、165-204 番目のアミノ酸配列が核移行に必要であることが明らかとなった。さらにこの配列中の塩基性アミノ酸クラスター K182/R183/R184 および K199/K200 をそれぞれアラニンに置換すると核移行できないことからこの配列が双極型の核移行シグナル (NLS) として働いている可能性が示唆された。
2. yeast two-hybrid の系を用いて MgcRacGAP と importin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  および  $\beta 1$  が結合するか否かを検討し、importin  $\alpha 1$  のみが MgcRacGAP と結合することを見出した。さらにバキュロウイルスの系を用いて importin  $\alpha 1$  および  $\beta 1$  を精製し、この精製タンパク質を用いた pull-down アッセイを行ったところ、MgcRacGAP は importin  $\alpha 1$  と結合するが  $\beta 1$  とは結合しないことを見出した。これらより MgcRacGAP は importin  $\alpha 1$  と直接結合し、 $\beta 1$  を介して核移行することが示唆された。
3. K182/R183/R184 および K199/K200 のそれぞれ、および両方のアラニン置換型変異体を作製し importin  $\alpha 1$  との相互作用を検討したところ、相互作用は見られなかった。これらの結果より、MgcRacGAP と importin  $\alpha 1$  の相互作用は K182/R183/R184 および K199/K200 の 2 つの塩基性アミノ酸クラスターからなる双極型 NLS 様の配列を介していることが強く示唆された。
4. ドミナントネガティブ変異体である importin  $\beta 1$  の C 末端欠失型変異体 ( $\beta 1\Delta 450-867$ ) を HeLa 細胞に過剰発現すると、ほとんどの内在性

MgcRacGAP が細胞質内にのみ局在し、核への移行が障害された。このことから MgcRacGAP が importin  $\beta$ 1 を利用して核移行していることが示唆された。

以上、本論文は細胞増殖、分化に関与する分子である MgcRacGAP の核移行の分子メカニズムにおいて、双極性の NLS を介して importin  $\alpha$ 1 と結合し、importin  $\beta$ 1 を利用して核移行していることを明らかにした。本研究は MgcRacGAP の細胞増殖、分化に関与する分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。