

Title	Purification and Characterization of REKS from Xenopus Eggs -Identification of REKS as a Ras-dependent MEK Kinase
Author(s)	黒田, 真也
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39027">https://hdl.handle.net/11094/39027</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〉をご参照ください。

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

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

Osaka University

氏名	黒田真也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11760 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Purification and Characterization of REKS from <i>Xenopus</i> Eggs — Identification of REKS as a <i>Ras</i> -dependent MEK Kinase (アフリカツメガエル卵からの REKS の精製と性状解析— <i>Ras</i> 依存性 MEK kinase としての REKS の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美  (副査) 教授 平野 俊夫 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

*Ras* は種々の外界シグナルの細胞内シグナル伝達系の構成因子として重要な役割を果たしている低分子量 G 蛋白質である。*Ras* には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型があり、GTP 結合型がその標的蛋白質に作用する。しかし、その標的蛋白質は高等生物ではなお不明である。最近、*Ras* がその標的蛋白質を介して MEK (MAP kinase kinase) / ERK (MAP kinase) カスケードを活性化することが明らかになっている。そこで、*Ras* の標的蛋白質を同定する目的で、GTP 結合型 *Ras* が MEK を活性化する cell-free assay を開発し、この cell-free assay を用いてアフリカツメガエル卵の細胞質画分から GTP 結合型 *Ras* 依存性に MEK を活性化するのに必要な蛋白質因子 (REKS: *Ras*-dependent ERK Kinase Stimulator) を同定している。

本研究では、この cell-free assay を用いて、*Ras* の標的蛋白質である REKS を精製し、その標品を用いて REKS の性状を解析することを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1) 材料の調製と cell-free assay

REKS の source としては、アフリカツメガエル卵を電気ショックにより interphase に導入し、MAP kinase を不活性型にした後、遠心して得られた細胞質画分を用いた。cell-free assay に用いる *Ras* は Ki-*Ras* および Ha-*Ras* をそれぞれ高発現した昆虫細胞 (Sf 9 cell) の細胞膜画分より精製して用いた。Ha-*Ras* と MEK, キナーゼネガティブ MEK, ERK 2 はグルタチオン S 転移酵素 (GST) との融合蛋白質として *E. coli* で発現させ精製して用いた。cell-free assay は、REKS 標品を GTP  $\gamma$ S 結合型 *Ras* および GDP 結合型 *Ras* 存在下で GST-MEK と GST-ERK 2 を加えてインキュベートした後、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) と [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を加え、REKS により MEK を介して活性化された ERK 2 による MBP のリン酸化を REKS 活性として測定した。

##### 2) アフリカツメガエル卵からの REKS の精製

上述の方法により得たツメガエル卵の細胞質画分を MonoQ 陰イオン交換カラムを用いて分画した後、cell-free assay により REKS 活性を測定した。その結果、三つのピークが得られた。このうち、二番目のピークのみが GTP  $\gamma$ S 結合型 *Ras* により特異的に活性化され、しかも、このピークのみが GST-MEK 依存性であることから二番目のピークが REKS であると考えられた。

### 3) REKS と *Ras* のコンプレックスフォーメーション

MonoQ カラムにより精製した REKS を GTP  $\gamma$ S 結合型 Ki-*Ras* あるいは GDP 結合型 Ki-*Ras* とインキュベートし、抗 *Ras* 抗体より免疫沈降した。REKS は GTP  $\gamma$ S 結合型 Ki-*Ras* 存在下で抗 *Ras* 抗体により免疫沈降された。一方、GDP 結合型 Ki-*Ras* 存在下や非 Ki-*Ras* 存在下では免疫沈降されなかった。次に、GTP  $\gamma$ S 結合型 GST-Ha-*Ras* と GDP 結合型 GST-Ha-*Ras* をそれぞれグルタチオンカラムに結合させたアフィニティーカラムを作成した。MonoS 陽イオン交換カラムで精製した REKS は GTP  $\gamma$ S 結合型 GST-Ha-*Ras* アフィニティーカラムに吸着し、還元型グルタチオンにより GST-Ha-*Ras* とともに溶出された。一方、GDP 結合型 GST-Ha-*Ras* アフィニティーカラムには吸着しなかった。これらの結果から、REKS は GTP  $\gamma$ S 結合型 *Ras* と特異的にコンプレックスを形成することが明らかとなった。

### 4) REKS による MEK のリン酸化

GTP  $\gamma$ S 結合型 GST-Ha-*Ras* アフィニティーカラムを用いて精製した REKS (Affinity purified REKS) を用いて、REKS が MEK をリン酸化する MEK kinase であるかどうかを検討した。REKS は野性型およびキナーゼネガティブの GST-MEK の両方をリン酸化したが、GST のみはリン酸化しなかった。したがって、REKS は MEK をリン酸化する kinase であることが明らかとなった。

### 5) REKS の同定

Affinity purified REKS を SDS-PAGE により解析したところ、分子量 98kDa の蛋白質が認められた。さらに、この蛋白質は自己リン酸化することからもプロテインキナーゼであると考えられた。この蛋白質は GDP 結合型 GST-Ha-*Ras* アフィニティーカラムでは認められなかった。したがって、この蛋白質が REKS である可能性が高いと考えられた。

### 6) REKS と既知の MEK kinase との関係

現在まで、MEK kinase としては *c-Raf-1* と *Mos*, *mStell1* が知られている。そこで、REKS とこれらの MEK kinase との関係を western blot 法により検討した。その結果、REKS は抗 *c-Raf-1* 抗体と抗 *Mos* 抗体、抗 *mStell1* 抗体によっては認識されなかった。したがって、REKS はこれらの MEK kinase と異なる新しい MEK kinase である可能性が高いと考えられた。

#### 【総括】

本研究では、cell-free assay を用いてアフリカツメガエル卵から REKS を高度に精製して性状を解析し、既知の MEK kinase とは異なる新しい MEK kinase であることを明らかにした。さらに分子量 98kDa の蛋白質を REKS として同定した。一方、*Ras* の標的蛋白質として *c-Raf-1* が知られているが、*in vitro* で *Ras* 依存性に MEK を活性化する報告はない。本研究により、*Ras* 依存性に MEK を活性化する MEK kinase は *c-Raf-1* とは異なる REKS であることが明らかとなった。しかし、REKS が *Raf* や *mStell1* のホモログである可能性もあり、REKS の cDNA をクローニングすることが必要である。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により cell-free assay を用いて *Ras* の標的蛋白質である REKS を精製しその性状を解析した。その結果、REKS は GTP 結合型 *Ras* と特異的にコンプレックスを形成することを明らかにした。さらに REKS は MEK をリン酸化するプロテインキナーゼで、その分子量が 98kDa であることを明らかにした。また、REKS は既知の MEK キナーゼである *c-Raf-1* や *Mos*, *mStell1* とは異なる MEK キナーゼであることを明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。