

Title	Involvement of CPP32/Yama (-like) Proteases in Fas-mediated Apoptosis
Author(s)	長谷川, 順一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/40042">http://hdl.handle.net/11094/40042</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	はせがわ じゅんいち 長谷川 順一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13049 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Involvement of CPP32/Yama (-like) Proteases in Fas-mediated Apoptosis (Fas を介したアポトーシス誘導における CPP32/Yama (様) プロテアーゼの関与)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉  (副査) 教授 辻本 賀英 教授 長田 重一

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

哺乳動物 *ice* (interleukin-1  $\beta$  converting enzyme, システインプロテアーゼの一種) 遺伝子が、線虫のプログラム細胞死(アポトーシス)の実行に不可欠な *ced-3* (*ced, cell death abnormal*) の相同遺伝子であることが示されて以来、ICE/CED-3 ファミリープロテアーゼがアポトーシスのシグナル伝達における重要な因子であると考えられるようになった。

アポトーシスは種々の刺激で誘導されるが、Fas 刺激によるものは、特異的な細胞表面受容体から出されるシグナルにより短時間にアポトーシスが起るため、アポトーシスのメカニズムを解明する上で適した系の1つと考えられる。近年、この Fas 刺激によるアポトーシス誘導に ICE/CED-3 ファミリープロテアーゼが関与していることが、ICE 欠損マウス、および ICE 様プロテアーゼ阻害蛋白、CrmA (cytokine response modifier A) を用いた阻害実験により証明された。

ICE/CED-3 ファミリープロテアーゼは、現在までにヒトにおいて10種類同定されているが、そのなかで CPP32 (32- kDa putative cysteine protease) は、ICE よりもさらに CED-3 に高い相同性を示し、かつ基質特異性が類似していることより、アポトーシス実行遺伝子としての重要性が示唆されている。

本研究の目的は、Fas を介したアポトーシスのシグナル伝達機構における CPP32 の関与の有無を明らかにすることである。

#### 【方法ならびに成績】

1) 抗 Fas 抗体に対し感受性のある各培養細胞における *ice* および *cpp32* 遺伝子発現の検討; バーキットリンパ腫株 Raji, 急性リンパ芽球性白血病株 Jurkat, 肝芽細胞腫株 HepG2 の3培養株, および Fas を遺伝子導入により高発現させた子宮頸癌株 HeLa (HeLa-Fas) に対し, *ice* および *cpp32* 遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。*ice* の発現は Raji 細胞にのみ検出できたのに対し, *cpp32* の発現はこれらすべての細胞で認められた。

2) 抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘導活性の定量化: アポトーシス誘導活性は Hoechst33342 にて蛍光染色し, 落射蛍光顕微鏡を用い, 核の形態変化により判定した。抗 Fas 抗体投与後, HeLa-Fas 細胞では4時間で95.5 $\pm$ 3.0%, HepG2 細胞では24時間で98.6 $\pm$ 0.5%の細胞に, アポトーシスの典型像である核の断片化が認められた。

3) ICE (様) および CPP32 (様) プロテアーゼ活性の測定: ICE (様) および CPP32 (様) プロテアーゼ活性の測

定は、ICEの基質であるIL-1 $\beta$ のプロセッシング部位の配列に相当するテトラペプチドをベースにしたYVAD-MCA、CPP32の基質であるPARP (poly (ADP-ribose) polymerase) の切断部位に相当するテトラペプチドをベースにしたDEVD-MCAをそれぞれ用いた。これらテトラペプチドを各細胞質分画と反応させ、遊離されるAMCを蛍光分光光度計にて測定し、この値をプロテアーゼ活性とした。HeLa-Fas細胞のCPP32(様)プロテアーゼ活性は、抗Fas抗体投与により上昇し、2時間後に最大値を示した。これに対し、ICE(様)プロテアーゼ活性化は認められなかった。

4) 抗Fas抗体によるアポトーシス誘導時の前駆体CPP32 (proCPP32) 蛋白のプロセッシングの確認: HeLa-Fas細胞の細胞質分画に、in vitro translation法により合成した [ $^{35}$ S] proCPP32を加え、37 $^{\circ}$ C、1時間反応後、SDS-PAGEに展開したところ、抗Fas抗体投与1時間後より、32kDaのproCPP32蛋白に加え、活性型CPP32のサブユニットに相当する17、12kDaの蛋白が検出された。同細胞質分画を、ヒトCPP32蛋白に対する抗体を用いたimmunoblot法により、CPP32蛋白の時間経過に伴う変化を検討したところ、抗Fas抗体投与1時間後より、proCPP32の量は減少し、3時間後には検出感度以下となった。一方、17kDaのサブユニットは2時間後より出現し、時間経過とともに増加した。

5) ICEおよびCPP32プロテアーゼに対する阻害剤によるFas誘導性アポトーシスの抑制効果: ICEおよびCPP32プロテアーゼに対する阻害剤は、それぞれYVAD-CHO、DEVD-CHOを使用した。HeLa-Fas細胞およびHepG2細胞の抗Fas抗体による核の形態変化は、DEVD-CHOの前処理により、濃度依存的に抑制されたのに対し、YVAD-CHOにはその効果が認められなかった。

6) CPP32過剰発現による、抗Fas抗体投与アポトーシス誘導の増強効果: HepG2細胞に*cyp32*発現ベクターをリポフェクション法により遺伝子導入し、ベクター遺伝子のみを導入した細胞との間で、抗Fas抗体投与によるアポトーシス誘導の程度を比較した。細胞の生存率の評価は、リポーター遺伝子として、*lacZ*発現ベクターを共導入し、X-Gal投与により細胞を発色させ、その発色細胞における形態変化率で判定した。*cyp32*遺伝子導入後の死細胞率は13.6 $\pm$ 1.5%で、ベクター遺伝子のみ導入後の死細胞率10.2 $\pm$ 3.1%との間に差が認められないのに対し、これら細胞に抗Fas抗体を投与することにより、ベクター遺伝子のみを導入した細胞の死細胞率が55.1 $\pm$ 8.7%、*cyp32*遺伝子を導入した細胞の死細胞率が88.3 $\pm$ 4.7%と、*cyp32*遺伝子導入により、抗Fas抗体投与後のアポトーシス誘導率が増大した。

#### 【総括】

1) *ice/ced-3*ファミリーである*ice*遺伝子の発現は、抗Fas抗体投与によりアポトーシスが誘導される4細胞株中3細胞株で、その発現が認められず、*ice*そのものの発現は、Fasを介したシグナル伝達に必須ではない事が示唆された。2) 抗Fas抗体に対し感受性のある細胞に抗Fas抗体を投与することにより、proCPP32を切断する活性、およびCPP32(様)プロテアーゼ活性が誘導され、それに引き続き核の断片化が認められた。この核の断片化はCPP32プロテアーゼ阻害剤により抑制された。3) *cyp32*の遺伝子導入は、抗Fas抗体投与時のアポトーシス誘導を増強した。

以上より、Fas刺激によるアポトーシスのシグナル伝達機構に、CPP32(様)プロテアーゼ活性が必須であることが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

Fas刺激によるアポトーシスのシグナルは、ICE/CED-3プロテアーゼファミリーを介して伝達されることが知られているが、これらプロテアーゼファミリーのうち、何れの分子が関与しているかは明らかではない。本研究は、Fas刺激により誘導されるアポトーシスに、CPP32(様)またはICE(様)プロテアーゼの何れの分子が関与しているかを検討したものである。

その結果、1) *cyp32*遺伝子は、抗Fas抗体投与によりアポトーシスが誘導される4細胞株全てにその発現が認められるのに対し、*ice*遺伝子の発現は、4細胞株中3細胞株にその発現が認められないこと、2) Fas刺激によるア

ポトーシス誘導時には、proCPP32がプロセッシングされ、CPP32（様）プロテアーゼの活性が上昇する。この Fas 刺激によるアポトーシスは、CPP32プロテアーゼの阻害剤により抑制されるのに対し、ICE プロテアーゼの阻害剤にはその効果がないこと、3) *cpp32*の遺伝子導入は、抗 Fas 抗体投与時のアポトーシス誘導を増強することを示した。

以上より、CPP32（様）プロテアーゼは Fas 刺激によるアポトーシスに関与していることが明らかとなった。よって本研究は学位論文に値するものとする。