



Title	Involvement of CPP32/Yama (-like) Proteases in Fas-mediated Apoptosis
Author(s)	長谷川, 順一
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40042">https://hdl.handle.net/11094/40042</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">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	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 噴
	(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こるため、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 HepG 2 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  $95.5 \pm 3.0\%$ 、HepG 2 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°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 HepG 2 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 : HepG 2 細胞に *cpp32* 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。*cpp32* 遺伝子導入後の死細胞率は 13.6 ± 1.5% で、ベクター遺伝子のみ導入後の死細胞率 10.2 ± 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 ± 8.7%, *cpp32* 遺伝子を導入した細胞の死細胞率が 88.3 ± 4.7% と、*cpp32* 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) *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) *cpp32* 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

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考える。