Osaka University Knowledge Archive

Title	A Functional Role for Death Proteases in s-Myc- and c-Myc-Mediated Apoptosis
Author(s)	加々谷, 重英
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41241
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 86 】

氏　　名	加々谷　重　英（かがや　しげひで）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学位記番号	第　14210　号
学位授与年月日	平成10年12月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	A Functional Role for Death Proteases in s-Myc-and c-Myc-Mediated Apoptosis (s-Myc, c-Myc 依存性アポトーシスにおけるデスプロテアーゼの関与)
論文審査委員	(主査) 教授　辻本　賀英 (副査) 教授　長田　重一　　教授　内山　安男

論文内容の要旨

目的

近年，アポトーシス誘導の分子機構が精力的に研究され，そのシグナル伝達のメカニズムが明らかになってきた。最も研究が進んでいるFas，TNFレセプターを介したアポトーシスにおいては，システインプロテアーゼであるcaspasesの活性化がアポトーシス誘導に必須であることが報告されている。しかし，これらcaspasesが他のシグナル系によるアポトーシスにも関与しているかどうかは不明である。本研究では，がん遺伝子・がん抑制遺伝子の発現によるアポトーシスに焦点をあて，caspasesを中心にそのシグナル伝達機構の解明を試みた。その結果，c-MycやS-Myc，p53などの発現によって誘導されるアポトーシスにもcaspase-3様プロテアーゼの活性化が共通して要求されること，またc-MycやS-Mycが誘導するアポトーシスにおいてserine proteasesがcaspasesの上流で機能していること，などの点を初めて明らかにすることができた。

方法ならびに成績

1．c-MycやS-Mycの発現によるRat-1細胞への細胞死誘導

ラット線維芽細胞Rat-1にc-mycまたはS-myc遺伝子を導入し，それら遺伝子の高発現株Rat-1/CM細胞およびRat-1/SM細胞を得た。これら細胞を1％以下の血清濃度で培養することで，Myc依存的なアポトーシスが誘導できた。アポトーシス誘導はDNAの断片化，及び顕微鏡下でのアクリジンオレンジ染色による細胞形態の変化等で確認した。

2．Myc依存性アポトーシスにおけるcaspasesの関与

培地中の血清濃度を0.3％に低下させることでアポトーシスを誘導したRat-1/CM及びRat-1/SM細胞を集め，その細胞質液中のAc-YVAD-MCA（caspase-1様プロテアーゼの基質）並びにAc-DEVD-MCA（caspase-3様プロテアーゼの基質）の切断活性を測定した。その結果，いずれの細胞中においてもcaspase-1様プロテアーゼの活性化は検

出できなかったのに対し，caspase-3 様プロテアーゼは強く活性化していた。またこのプロテアーゼの活性化と細胞死は Z-Asp-CH_2-DCB (caspase 阻害剤)，Ac-DEVD-CHO (caspase-3 様プロテアーゼ阻害剤) などによってほぼ完全に抑制された。これらの結果から c-Myc や s-Myc の高発現によって誘導されるアポトーシスに caspase-3 様プロテアーゼの活性化が共通して関与していることが明らかになった。

3．Myc 依存性アポトーシスにおける serine proteases の関与

近年，細胞傷害性T細胞が標的細胞にアポトーシスを誘導する際に機能するセリンプロテアーゼ，グランザイムBが caspase-3 を直接活性化することが報告された。そこで，同様の機構が Myc 依存性アポトーシスにも機能しているかどうか検討するため，種々の serine protease 阻害剤の影響を調べた。その結果，AEBSF とよばれる serine protease の特異的阻害剤が，Myc 依存性アポトーシスならびに caspase-3 様プロテアーゼの活性化を強く阻害することがわかった。一方，AEBSF の不活性型アナログである AEBSA はこれらを全く阻害しなかった。また，AEBSF は caspase-3 様プロテアーゼ阻害活性を示さなかった。以上の結果から，Myc 依存性アポトーシス誘導に serine proteases が関与しており，それが caspase-3 様プロテアーゼの上流で機能しているということを初めて明らかにすることができた。また，AEBSF はグランザイムBを阻害しないことが報告されており，Myc 依存性アポトーシスにおいては別種の serine proteases が機能していると考えられる。

総括

本研究において，がん遺伝子 c-myc やがん抑制遺伝子 s-myc などの発現によって誘導されるアポトーシスにおいても，Fas や TNF レセプターを介する場合と同様に caspase-3 様プロテアーゼの活性化が要求されることを明らかにできた。同様の結果は p53の標的遺伝子である Bax によるアポトーシスにおいても観察された(副論文)。これらの結果は caspase カスケードが種々の刺激によるアポトーシスのシグナル伝達系で中心的役割を果たしていることを示している。また，今回 caspase カスケードの上流で serine proteases が機能していることを明らかにできたことは，今後のアポトーシスのシグナル伝達機構の解明に大きく貢献できるものと考える。さらに，今回得られた結果は細胞のがん化におけるアポトーシスの存在意義に関する研究にも応用できるものと信ずる。事実共同研究者によって，T細胞性リンパ腫の発生に c-Myc と協調して機能することが報告されているセリンスレオニンキナーゼ Pim-1 に Myc 依存性アポトーシスのシグナル伝達を活性化する能力のあることが示された（副論文)。

論文審査の結果の要旨

癌遺伝子 c-Myc はアポトーシス誘導機構をも有している。これは c-Myc が細胞癌化を引き起こすことなく機能するための重要な防御機構であると考えられている。しかし，その分子機構は未だ明らかではない。本研究は，癌遺伝子 c-Myc，ならびにそのホモログ s-Myc 依存性のアポトーシスにおいて，Caspases をはじめとするプロテアーゼの関与に焦点を当て，そのシグナル伝達機構の解明を試みたものである。その結果，1）c Myc や s Myc 依存性アポトーシスに Caspase-3 様プロテアーゼの活性化が要求されること，2）c-Myc や s-Myc 依存性アポトーシスにおいてセリンプロテアーゼが Caspase-3 様プロテアーゼの上流で機能していることを初めて明らかにした。1）の結果は，Myc 依存性アポトーシスが，Fas や TNF レセプターによるアポトーシスと同様の経路を利用していることを示している。これは，Caspase-3 様プロテアーゼがアポトーシス刺激の差異を越えて，広くアポトーシス誘導に機能していることを示したものである。また，2）の結果は，Myc 特有のデスプロテアーゼが Caspase-3 様プロテアーゼ上流に存在することを示唆している。今後，このプロテアーゼを同定することによって，Myc 依存性アポトーシス誘導の分子機構を明らかにできるものと考えられる。

以上の理由により，本研究結果は，Myc 依存性アポトーシスの分子機構の解明に貢献したものであり，学位授与に値すると考える。