

- 1443.
- [4] Blasco, M. A. et al., 1995, *Science*, **269**: 1267-1270.
- [5] Feng, J., et al., 1995, *Science*, **269**:1236-1241.
- [6] Linger, J., et al., 1995, *Science*, **276**:561-566.
- [7] Kim, N. W., et al., 1994, *Science*, **266**: 2011-2015.
- [8] Shay, J. W., et al., 1996, *Curr. Opin in Oncology*, **8**:66-71.
- [9] Quiet, C. A., et al., 1995, *J Clin Oncol.*, **12**:1144-1151.
- [10] Von Zglinick, T., et al., 1995, *Exp Cell Res.*, **220**:186-193.

## CPP32 研究进展

姚 潇 叶棋浓\* 袁仕取

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062 \*军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

凋亡 (Apoptosis), 或称编程性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD), 在胚胎发育、免疫系统形成、内环境稳定等方面起重要作用。PCD 是一种由基因控制的自主性细胞死亡过程, 它的发生受激素、神经、免疫等因素的调控, 其分子机制极为复杂。在 PCD 分子生物学的研究中, 许多蛋白酶尤其是许多蛋白酶同源物的发现, 使蛋白酶在细胞凋亡中的重要作用越来越为人们所关注。目前发现的一类并成为研究热点的是 ICE (Interleukin-1  $\beta$  Converting enzyme) 家族蛋白酶<sup>[1]</sup>。该家族蛋白酶属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (aspartate specific cysteine protease, ASCP), 围绕活性中心位点半胱氨酸的氨基酸残基是保守的, 都为 QACRG 五肽, 分子内都含有分子量约为 20kD (P20) 和 10kD (P10) 两个亚单位。这两个亚单位是这些酶发挥生物学活性所必需的, 五肽序列在 P20 亚单位中。目前发现的 ICE 家族成员包括: ICE、Nedd2、CPP32、Mch2、Mch3、Mch4、Mch5、Mch6、CAP、TX、ICERe1-III 等, 它们与所有凋亡细胞的死亡有关<sup>[2]</sup>。其中 CPP32 (cysteine protease P32) 在凋亡过程中起着非常关键的作用, 对其研究也越来越多。

### 一、CPP32 的发现及其特征

1994 年 Fernander-Alnemri 等<sup>[3]</sup> 利用 RT-PCR 技术, 从人 T 淋巴细胞文库中筛选到

了 CPP32 基因 (又叫 Yama, apopain), 分为 CPP32 $\alpha$  和 CPP32 $\beta$ ; 同样, Tewari 等<sup>[4]</sup> 从人脐静脉内皮细胞文库中筛选到了 CPP32 $\beta$ 。CPP32 $\alpha$  与 CPP32 $\beta$  的可读框均由 831 个核苷酸组成, 编码 277 个氨基酸, 分子量约为 32kD。它们在第 395 和 794 位的核苷酸不同, 第 395 位核苷酸的不同不改变所编码的氨基酸, 而第 794 位核苷酸的不同使编码氨基酸由天冬氨酸 (CPP32 $\alpha$ ) 变成了谷氨酸 (CPP32 $\beta$ ), 但两者功能相同。人 CPP32 基因定位于染色体 4q33-q35.1 处<sup>[5]</sup>。CPP32 在免疫细胞、脑和胚胎起源的细胞中高水平表达。Juan 等<sup>[6]</sup> 克隆得到了鼠 CPP32 $\beta$  基因, 它在脾中高水平表达, 在脑、肺、肝、肾等中表达水平较低。鼠 CPP32 $\beta$  基因组 DNA 长约 20kb, 包括 7 个外显子和 6 个内含子, 定位于鼠 8 号染色体中间区域。

### 二、激活 CPP32 的蛋白酶

正常情况下, 胞质中 CPP32 以无活性的分子量约为 32kD 的 CPP32 酶原 (pro-CPP32) 存在, 只有当细胞进行凋亡时才变为有活性的 CPP32。激活是一个产生 P20/P10 杂二聚体的蛋白水解事件。

到目前为止, 发现激活 CPP32 的蛋白酶有

本文承蒙军事医学科学院生物工程研究所苏国富研究员审阅, 特表谢意。

Granzyme B (GranB)、ICE、Mch4、Mch2 $\alpha$ 、CAP。GranB是由细胞毒T淋巴细胞和自然杀伤细胞表达的一种与细胞质颗粒体(granule)相关的丝氨酸蛋白酶,这些细胞通过GranB的释放可快速降解DNA和诱导靶细胞凋亡<sup>[7]</sup>(见图1)。在体外,GranB切割CPP32酶原产生有活性的20kD大亚单位和10kD小亚单位,该加工发生于CPP32两个亚单位IETDS序列的D与S氨基酸处<sup>[8]</sup>。在重建的细胞体系中,GranB对CPP32的加工类似于体外<sup>[9]</sup>。ICE能切割CPP32酶原而得到有活性的P20和P10亚单位。通过这种方式活化的CPP32能切割PARP[poly(ADP-ribose) polymerase]成为85kD的凋亡片段<sup>[4]</sup>。在许多形式的凋亡包括由放疗、化疗引起的细胞死亡中,均可观察到116kD的PARP被切割成85kD的片段。这已被作为凋亡过程的特征性标志,因此又叫凋亡片段。 $Ca^{2+}$ 离子载体或低氧诱导的细胞死亡可导致ICE蛋白酶活性的增加,然后进一步激活CPP32。抗凋亡蛋白Bcl-2或Bcl-xL的过量表达可抑制细胞凋亡和ICE、CPP32蛋白酶的激活。在体内,特异性抑制蛋白酶ICE将阻止CPP32蛋白酶的活化,而特异性的抑制CPP32不阻止ICE的活化,表明体内ICE作用在CPP32的上游<sup>[10]</sup>。

Mch4来源于单链酶原,在活性位点含有QACQG五肽,而不是上述ASCP活性位点含有的QACRG。其N末端含有FADD(Fas-associated death domain)样死亡因子结构域,表明可能与FADD相关。通过FADD激活的Mch4酶原(proMch4)可导致下游蛋白酶的活化。即Mch4在五肽IXXDS序列的D和S氨基酸之间切割CPP32酶原,产生有活性的CPP32,并发挥生物学作用<sup>[10]</sup>。

Mch2 $\alpha$ 与以上蛋白酶(GranB、ICE、Mch4)相似,成熟的Mch2 $\alpha$ 能在IETDS序列的D与S氨基酸之间加工CPP32酶原,该加工伴随着CPP32的活化<sup>[11]</sup>。鼠体内激活CPP32的蛋白酶称为CAP(CPP32 activating protease)。CAP

是人源ICE家族的同源物,由19kD和13kD两个多肽组成,类似于Mch2 $\alpha$ 。在鼠体内CAP可激活CPP32酶原,变成有活性的CPP32。CAP的活性可被阻止细胞凋亡的牛痘病毒蛋白CrmA(cytokine response modified antigen)抑制<sup>[12]</sup>。

### 三、CPP32的作用底物

到目前为止,发现CPP32的作用底物有DNA-PK、PARP、D4-GDI、Mch6、Mch2 $\alpha$ 、SREBPs。DNA依赖的蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)至少由三个部分组成:460kD催化亚单位(DNA-PKcs)和由两个亚单位组成的异二聚体Ku。它们参与DNA双链断裂修复过程。据研究认为DNA-PKcs是SCID(severe combined immune deficiency)基因的产物,该位点纯合突变的动物在DNA双链断裂修复中有缺陷;Ku的两个亚单位负责与不同双链DNA末端结合。因此,DNA-PK是一个重要的哺乳动物DNA损伤修复物质。凋亡诱导试剂可降解DNA-PKcs,而Ku仍完好无损。DNA-PKcs的降解导致DNA-PK活性的丧失,随之引发细胞凋亡。体外利用蛋白酶抑制剂表明DNA-PKcs的降解与CPP32切割有关,其切割产生的150kD的片段与细胞进行凋亡时产生的凋亡片段大小一致。CPP32切割DNA-PKcs的位点在DEVDN序列第2712位的D和2713位的N氨基酸之间<sup>[13]</sup>。

在多数情况下,116kD的PARP被蛋白酶切割以后,细胞便进入凋亡途径,最终导致细胞死亡。所以PARP也被称为死亡底物(Death substrate)。CPP32能切割PARP产生85kD的凋亡片段,这个过程可被bcl-2或牛痘病毒CrmA蛋白抑制。PARP的切割位点在DEVGD序列中第216位的D和第217位的G氨基酸之间<sup>[4]</sup>。PARP也是一种与DNA断裂修复有关的酶,在维持基因组稳定性方面起重要作用。

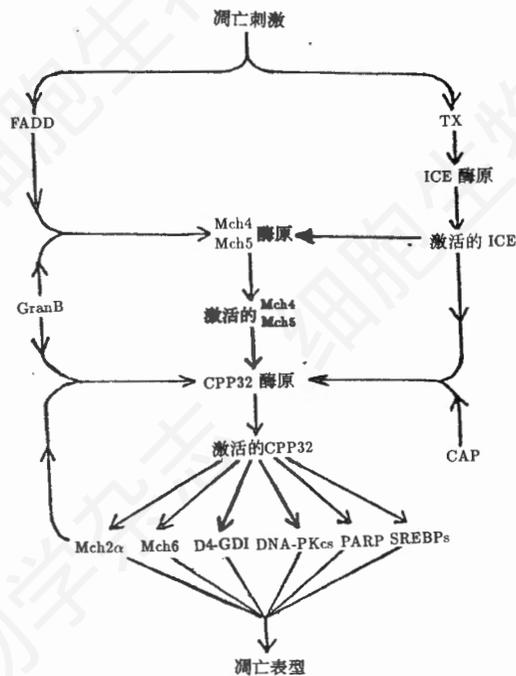


图1 蛋白酶级联切割示意图

D4-GDI 是淋巴和骨髓细胞 GTP 酶的调节物,是造血细胞 GDP 分解抑制物。当 Fas 与激动抗体 (agonistic antibody) 交联后, Jurkat 细胞内的 D4-GDI 很快被切割成 23kD 的片段。在体外,大肠杆菌表达的重组 CPP32 也能切割 D4-GDI 产生 23kD 的片段。D4-GDI 的切割可被 CPP32 选择性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 完全抑制,表明上述 Jurkat 细胞内有 CPP32 的参与。D4-GDI 的切割位点位于 DELDS 序列第 19 位的 D 和第 20 位的 S 氨基酸之间<sup>[14]</sup>。

Mch6 酶原和 Lamin 切割酶 Mch2 $\alpha$  也是成熟 CPP32 的底物。Mch6 酶原在大小亚单位之间含有两个可能的加工序列。其中一个为 GranB 的切割位点,另一个为 CPP32 的切割位点。定点诱变分析表明 CPP32 优先从第 330 位天冬氨酸处切割 Mch6 酶原,产生分子量约为 37kD 和 10kD 两个切割片段;Mch2 $\alpha$  位于 CPP32 下游,通过 CPP32 作用而活化。在体外, CPP32 可在多个位点切割 Mch2 $\alpha$  酶原产生分子量约为 21, 18, 13 和 11kD 四种切割产

物。进一步作用将导致 21 和 13kD 产物减少而 18 和 11kD 产物增加,说明后者是成熟 Mch2 $\alpha$  的大小亚单位。CPP32 加工 Mch2 $\alpha$  酶原的位点分别在第 23、179、193 位的天冬氨酸处。CPP32 加工的 Mch2 $\alpha$  能切割 Lamin, 表明已使 Mch2 $\alpha$  酶原活化。因此, CPP32 即是 Mch2 $\alpha$  的作用底物,而激活的 Mch2 $\alpha$  反过来又可进一步切割 CPP32, 形成一个蛋白酶级联切割放大循环<sup>[12]</sup>。

细胞内胆固醇的平衡由称为固醇调节元件结合蛋白 (sterol-regulatory element binding proteins, SREBPs) 的蛋白水解作用控制。在体外, CPP32 在螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构域和第一转膜结构域之间的一个天冬氨酸处切割 SREBP-1 和 SREBP-2, 释放有转录活性的片段。在 CHO 细胞中, CPP32 同样以无活性的 32kD 形式存在。当蛋白激酶抑制剂 Staurosporine 诱导 CHO 凋亡时, CPP32 被切割为 P20 和 P10 亚单位, 形成有活性的蛋白酶。在这种情况下, 与核膜结合的 SREBP-1 和 SREBP-2 被切割, 并且在核提取物中发现有活性的 N-端转录片段, 表明在凋亡过程 CPP32 是中心介导体, 同时也表明 SREBPs 是 CPP32 的作用底物<sup>[15]</sup>。

#### 四、在凋亡过程中 CPP32 起核心作用

现有的证据表明, 蛋白酶与细胞凋亡密切相关, 凋亡似乎是蛋白酶级联切割的过程<sup>[16]</sup>。不同的蛋白酶在不同凋亡阶段发挥功能, 有些在凋亡早期行使功能, 有些则在晚期发挥作用。但总的来说, 在蛋白酶级联切割过程中, CPP32 处于核心位置, 可能发挥非常重要的作用。因此被称为死亡蛋白酶。不同的蛋白酶分别切割 CPP32 酶原, 从而激活 CPP32。活化的 CPP32 进一步又切割不同的底物, 导致蛋白酶级联切割放大<sup>[11]</sup>, 最终使细胞走向死亡途径。虽然对 CPP32 的研究报道已为数不少, 对其在凋亡过程中所起的作用也有一定程度的认识, 但仍有

很多问题没有解决,如 CPP32 参与凋亡的具体作用机制、其他与凋亡有关的基因(如抑癌基因、癌基因、细胞因子等)与 CPP32 的相互关系,人为地调控 CPP32 活性来防治与凋亡相关的疾病(如肿瘤)等还有待于人们去探索。相信随着研究的深入,人们对 CPP32 的作用、功能会有更加完善的认识,进而为完全阐明凋亡的分子生物学机制奠定基础。

### 摘 要

CPP32 是一个由 277 个氨基酸组成分子量约为 32KD 的蛋白酶。编码 CPP32 的基因有  $\alpha$ 、 $\beta$  两种形式,但两种基因形式编码的蛋白酶在功能上相同。CPP32 与细胞凋亡密切相关。在蛋白酶级联切割的凋亡过程中, CPP32 处于核心位置,可能起非常重要作用。上游蛋白酶对其进行切割加工,使其活化;活化的 CPP32 又切割加工下游底物,导致细胞凋亡。

### 参 考 文 献

[1] Kumar S. et al., 1995, *TIBS*, 20: 198 - 202.

- [2] Henkart PA. et al., 1996, *Immunity*, 4:195 - 201.
- [3] Fernandes Alnemri T, et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:30761-30764.
- [4] Tewari M, et al., 1995, *Cell*, 81: 801 - 809.
- [5] Tiso N, et al., 1996, *Biochem Biophys Res Commun.*, 225:983-989.
- [6] Juan TS, et al., 1996, *Oncogene*, 13:749-755.
- [7] Shi L, et al., 1991, *J. Exp. Med.*, 175: 553-566.
- [8] Darmon AJ, et al., 1995, *Nature*, 377:446 - 448.
- [9] Martin SJ, et al., 1996, *EMBO J.*, 15: 2407-2416.
- [10] Shimizu S, et al., 1996, *Oncogene*, 12:2251 - 2257.
- [11] Srinivasula SM, et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:27099-27106.
- [12] Liu X, et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271 (23):23371-23376.
- [13] Song Q, et al., 1996, *EMBO J.*, 15:3238 - 3246.
- [14] Na S, et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271: 11209-11213.
- [15] Wang X, et al., 1996, *EMBO J.*, 15:1012 - 1020.
- [16] Steller H, et al., 1995, *Science*, 267:1445 - 1448.

## 果蝇卵母细胞决定分子机制的研究

王 重 赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

生殖细胞的发生是连接亲子两代发育的桥梁,在生物体发育进程中占有极其重要的地位。其中,动物雄性生殖细胞的主要作用是提供单倍体基因组;而雌性生殖细胞除此之外,还提供了几乎全部的细胞质,其中包含胚胎发育所需的营养物质和胚胎构建所需的位置信息。因此,研究生殖细胞的发生,特别是雌性生殖细胞的发生,具有极其重要的意义。

生殖细胞的发生大致包括以下两个阶段:第一阶段是原始生殖细胞(Primordial germ cell)迁移至生殖腺中,经过性别快定,建立起两性生殖干细胞(Stem cell);第二阶段,生殖干

细胞经过一系列的有丝分裂和减数分裂,产生生殖细胞——精子和卵子。

研究卵发生的动物模型常用三个:具滋昆虫(Meroistic insects)如果蝇(*Drosophila melanogaster*);无尾两栖类(Anuran amphibians)如爪蟾(*Xenopus*)和胎生哺乳动物(Placental mammals)。尽管三者卵发生的途径各异,但是也拥有许多共性,例如都在发育早期形成细胞间胞质通道,进行物质和信息交流<sup>[1]</sup>。相对于其他两种模型来说,果蝇卵的形态发生过程简单,遗传背景清楚,技术方法也比较成熟,因此许多科学家选择了果蝇作为材料,研究卵