博士（獣医学）　石　井　辰　矢

学位論文題名

# Biochemical analyses of proinsulin C-peptide-binding protein and its binding properties

（プロインスリンC-ペプチド結合タンパク質とその結合特性の生化学的解析）

## 学位論文内容の要旨

C-ペプチドはインスリンとともにプロインスリンから生じ、インスリン分泌に伴って血中に放出される。インスリンが多様な作用を持つホルモンとして知られる一方で、C-ペプチドは長い間生理活性を持たないと考えられてきた。しかしながら、近年C-ペプチドは慢性の１型糖尿病患者にみられる腎障害や神経障害などの種々の合併症を改善する生理活性ペプチドであることが明らかとなった。また、C-ペプチドが動脈硬化症患者では動脈中膜に蓄積することにより好中球の走化を誘導し病態の進行に関与する可能性も報告されている。

C-ペプチドには特異的な受容体が存在し、その受容体を介したシグナル伝達によりこれらの作用が誘導されることが示唆されているが、受容体の同定は未だなされていない。そこで本研究では、細胞膜表面に発現しC-ペプチドと結合するタンパク質を同定し、同定したタンパク質との相互作用を明らかにすることを目的とした。

C-ペプチドが好中球の走化を誘導することから、ヒト前骨髄性白血病細胞株HL60細胞を用いてヒトC-ペプチドへの走化性を調べたところ、HL60細胞はC-ペプチドに対して有意な走化応答を示した。そこでHL60細胞とC-ペプチドを低温で反応させ、化学架橋剤により固定した後、可溶化してC-ペプチド抗体で免疫沈降し、沈降物を二次元電気泳動法により分離した。その結果、対照と異なる特異的なスポットが1つ検出され、質量分析によりα-エノラーゼと同定された。

α-エノラーゼは、細胞質に存在する解糖系酵素であるが、細胞膜上への発現とプラスミノーゲンの受容体として機能することが報告されている。α-エノラ

ーゼとプラスミノーゲンの結合は、タンパク質のC末端塩基性アミノ酸を切断するカルボキシペプチダーゼB（CpB）およびリジン様物質であるε-アミノカプロン酸（EACA）により阻害される。つまり、α-エノラーゼのC末端リジン残基がプラスミノーゲンとの結合に重要とされる。そこで、細胞膜にα-エノラーゼの発現が確認できたマウス繊維芽細胞A31細胞を用いてextracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化（活性化）を指標としてヒトC-ペプチドの応答を調べた。細胞にC-ペプチドを加えるとプラスミノーゲンと同様にERKの活性化が見られた。しかし、CpBで前処理したA31細胞や培地中にEACAを共存させると、C-ペプチドあるいはプラスミノーゲン刺激によるERKの活性化はほとんど見られなかった。このことから、C-ペプチドのシグナル伝達にはα-エノラーゼのようにC末端部にリジン残基を持つ分子が重要であることが示唆された。

そこで、C-ペプチドとα-エノラーゼとの相互作用を詳細に検討するため、α-エノラーゼの酵素活性（基質2-ホスホグリセリン酸：2-PGのホスホエノールピルビン酸への変換）に及ぼすC-ペプチドの影響について検討した。組換えα-エノラーゼの反応速度は酵素単独時と比べC-ペプチド共存下で高まり、反応速度論に基づく解析により、この変化は最大速度(Vmax)の増大ではなく2-PGに対するKm値を低下させることが明らかとなった。次いで、α-エノラーゼとC-ペプチドのモル比を変えて酵素活性を測定したところ、C-ペプチドの効果はα-エノラーゼとC-ペプチドを等モル比にした際に最大となり、倍量のC-ペプチドを加えてもさらなる影響は見られなかった。さらにα-エノラーゼのC末端リジン残基を中性アミノ酸であるアラニン、酸性アミノ酸であるグルタミン酸、塩基性アミノ酸であるアルギニンに置換した変異体（それぞれK434A、K434E、K434R）を作製し、C-ペプチドの作用について検討した。C-ペプチド非存在下において何れの変異体酵素も野生型α-エノラーゼ（K434）と同等の酵素活性を示したが、K434AとK434Eに対してC-ペプチドは修飾作用を示さなかった。一方、野生型と同じ塩基性アミノ酸を持つK434RはC-ペプチドにより酵素活性が上昇した。以上のことから、C-ペプチドはα-エノラーゼの活性中心や基質に影響するのではなく、α-エノラーゼのC末端リジン残基と1：1の量比で結合することで、おそらくは酵素の

立体構造を変化させ、基質に対する見かけ上の親和性を高めたと考えられた。

一方、用いたヒトC-ペプチドは31アミノ酸からなり、種を越え保存されている27番目のグルタミン酸残基が細胞膜との結合に重要であると示唆されている。そこで、ヒトC-ペプチド由来のペプチド断片[F1 (1-26), F2 (27-31), F3 (1-5), F4 (6-31), F5 (28-31), F6 (E27A-31)]およびラットC-ペプチドのC末端5残基ペプチド[F7 (27-31)]を用いて、α-エノラーゼ（K434）活性の修飾について検討した。C-ペプチドの27番目のグルタミン酸を含んだF2、F4、F7では全長のC-ペプチドと同様にKm値の低下が誘導された。これに対してF1、F3ではKmとともにVmaxが低下する傾向がみられたが、F5、F6では酵素活性の修飾は見られなかった。これらの結果から、α-エノラーゼとの相互作用にはC-ペプチドの27番目のグルタミン酸残基が重要であることが示唆された。

以上のようにC-ペプチドはα-エノラーゼと1：1のモル比で結合し、その結合にはα-エノラーゼのC末端リジン残基が持つ正の電荷とC-ペプチドの27番目のグルタミン酸残基が持つ負の電荷による静電的な結合が関与していると考えられた。またこの結合により、C-ペプチドがアロステリックエフェクターとしてα-エノラーゼの立体構造に変化を起こし、α-エノラーゼの酵素活性に影響したと考えられる。さらにC-ペプチドシグナルの伝達には、細胞膜上に発現するα-エノラーゼあるいはC末端部にリジン残基を持つ分子とC-ペプチドとの相互作用が重要であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　木　村　和　弘
副　査　　教　授　　稲　葉　　睦
副　査　　教　授　　石　塚　真由美
副　査　　准教授　　寺　尾　　晶

学 位 論 文 題 名

## Biochemical analyses of proinsulin C-peptide-binding protein and its binding properties

## （プロインスリンC-ペプチド結合タンパク質とその結合特性の生化学的解析）

C-ペプチドはプロインスリンから生じ、インスリン分泌に伴って血中に放出される。近年になってC-ペプチドに糖尿病合併症を改善する生理活性が認められたが、その受容体は未だ同定されていない。本博士論文では、先ず細胞膜表面に発現しC-ペプチドと結合するタンパク質の同定が試みられた。C-ペプチドに対して走化性を示したヒト前骨髄性白血病細胞株HL60細胞が用いられ、C-ペプチドの化学架橋剤による細胞表面への固定、可溶化、C-ペプチド抗体での免疫沈降、沈降物の二次元電気泳動解析および質量分析によりC-ペプチドと特異的に共沈したタンパク質としてα-エノラーゼが推定された。

α-エノラーゼは細胞質に存在する解糖系酵素である。次にα-エノラーゼの酵素活性を指標にC-ペプチドとα-エノラーゼとの相互作用が検討された。組換えα-エノラーゼ活性の反応速度論に基づく解析により、C-ペプチドは最大速度には影響せず、基質に対するKm値を低下させることが明らかとなった。またC-ペプチドの効果はα-エノラーゼとC-ペプチドを等モル比にした際に最大となった。さらに変異組換えα-エノラーゼ活性の解析から酵素のC末端リジン残基がその相互作用において重要であることが示された。一方、ヒトC-ペプチドは31アミノ酸からなり、種を越え保存されている27番目のグルタミン酸残基が細胞膜との結合に重要であると示唆されている。そこで、ヒトC-ペプチド由来のペプチド断片を用いて、α-エノラーゼ活性の修飾について検討したところ、やはりα-エノラーゼとの相互作用にはC-ペプチドの27番目のグルタミン酸残基が重要であった。

α-エノラーゼは細胞質のみならず細胞膜上に発現し、プラスミノーゲンの受容体として機能することも知られる。次に細胞膜上にα-エノラーゼの発現が確認できたマウス繊維芽細胞A31細胞を用いてextracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化を指標としてヒトC-ペプチドの応答が調べられた。C-ペプチドとプラスミノーゲンはERKのリン酸化を亢進させ、両者による亢進はタンパク質のC末端塩基性アミノ酸を切断するカルボキシペプチダーゼBおよびリジン様物質であるε-アミノカプロン酸により阻害された。従って、C-ペプチドはα-エノラーゼと特異的相互作用を示し、C-ペプチドシグナルの伝達には、細胞膜上に発現するα-エノラーゼあるいはC末端部に塩基性アミノ酸を持つ分子とC-ペプチドとの相互作用が重要であることが示唆された。

以上のように、本研究は、新規にプロンスリンC-ペプチドと細胞膜の相互作用機構を明らかにしたものであり、哺乳動物の生理学に貢献が大である。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者、石井辰矢氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。