

Title	A functional epitope on p-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) but not to sialyl Lewis X oligosaccharides
Author(s)	廣瀬, まゆみ
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40771">https://hdl.handle.net/11094/40771</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	ひろせ まゆみ 廣瀬 まゆみ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13714 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	A functional epitope on p-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) but not to sialyl Lewis X oligosaccharides (P-セレクトインと PSGL-1との結合に関与するがシアリルルイスXとの結合には関与しない P-セレクトイン上の新規機能エピトープの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之  (副査) 教授 平野 俊夫    教授 菊谷 仁

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

活性化血管内皮細胞および活性化血小板に発現するレクチン様細胞接着分子 P-セレクトインは、急性炎症における白血球浸潤に重要な役割を果たしていることがノックアウトマウスを用いた解析などから明らかとなっている。この P-セレクトインの特異的なリガンドとして、白血球上に発現するムチン様糖タンパク質である P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) が知られている。この P-セレクトインと PSGL-1との結合には、PSGL-1が sLe<sup>x</sup> 様糖鎖構造を持ち、かつチロシン残基が硫酸化されていることが必要であることが明らかにされている。一方、P-セレクトイン上の PSGL-1との結合部位については詳細な解析がなされていない。我々は、抗ラット P-セレクトインモノクローナル抗体を作製し、PSGL-1との結合に関与する P-セレクトイン上の機能的部位の解析を試みた。

#### 【方法ならびに成績】

はじめに、可溶性ラット P-セレクトイン (ラット P-セレクトイン-IgG) あるいは P-セレクトインを発現することが知られている活性化ラット血小板でアルメニアンハムスターを免疫し、9つの抗ラット P-セレクトインモノクローナル抗体を樹立した。つぎに、樹立したこれらの抗体のリガンド結合阻害活性を検討するために、活性化血小板と PSGL-1陽性 HL-60細胞の結合実験にこれらの抗体を加えた。その結果、これらの抗体のうち C215抗体のみが、PSGL-1に対する中和抗体である PL1と同様、ほぼ完全に活性化血小板と HL-60細胞の結合を阻害した。さらに、C215抗体が P-セレクトイン-IgG と HL-60細胞由来 PSGL-1分子との結合を阻害することを免疫沈降により確認した。これまで知られている抗 P-セレクトイン中和抗体はいずれも P-セレクトインと sLe<sup>x</sup>糖鎖との結合を阻害することが知られている。そこで、P-セレクトイン-IgG と sLe<sup>x</sup>糖鎖との結合実験にこれらの抗体を加えその阻害効果を検討した。その結果、C215抗体を含む9つの抗体はいずれも P-セレクトインと sLe<sup>x</sup>糖鎖との結合を阻害しなかった。従って C215抗体は P-セレクトインと sLe<sup>x</sup>糖鎖との結合を阻害しないが、PSGL-1との結合を特異的に阻害する極めてユニークなモノクローナル抗体であると考えられた。96種の P-セレクトイン由来合成ペプチドを結合させたシートを用いたドットプロット解析の結果、C215抗体のエピトープは P-セレクトインのアミノ酸番号76から83に相当する WADNEPNNであった。つぎに、C215抗体のエピトープを含むオリゴペプチドを合成し、先の活性化血小板と HL-60細胞の結合実験および P-セレクトイン-IgG と sLe<sup>x</sup>糖鎖との結合実験に加えてその阻害効果を検討した。その結果、

このペプチドはC215抗体と同様にP-セレクトインとPSGL-1の相互作用依存性の活性化血小板とHL-60細胞との結合を阻害したが、P-セレクトインとsLe<sup>x</sup>糖鎖との結合は阻害しなかった。以上から、WADNEPNNはP-セレクトイン上の新規機能エピトープである可能性が示唆された。

#### 【総括】

我々は、P-セレクトインとPSGL-1との結合は阻害するがsLe<sup>x</sup>との結合は阻害しないモノクローナル抗体C215を樹立し、この抗体がP-セレクトイン上の8アミノ酸よりなるエピトープすなわちWADNEPNNを認識することを明らかにした。さらに、この8アミノ酸よりなる合成ペプチドがC215抗体と同様に、P-セレクトインとPSGL-1の結合を特異的に阻害するがP-セレクトインとsLe<sup>x</sup>糖鎖の結合は阻害しないという結果を得た。これまで、sLe<sup>x</sup>糖鎖結合ドメインのみがP-セレクトイン上の機能ドメインと考えられてきた。しかし、本研究により、P-セレクトイン上のアミノ酸76から83番のWADNEPNNがPSGL-1上の硫酸化チロシンなどのコア蛋白上の機能的部位を認識する新規機能エピトープである可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

P-セレクトインとPSGL-1との結合は阻害するがsLe<sup>x</sup>との結合は阻害しないモノクローナル抗体C215を樹立し、この抗体がP-セレクトイン上の8アミノ酸よりなるエピトープすなわち“WADNEPNN”を認識することを明らかにした。さらに、この8アミノ酸よりなる合成ペプチドがC215抗体と同様に、P-セレクトインとPSGL-1の結合を特異的に阻害するがP-セレクトインとsLe<sup>x</sup>糖鎖の結合は阻害しないという結果を得た。これまで、sLe<sup>x</sup>糖鎖結合ドメインのみがP-セレクトイン上の機能ドメインと考えられてきた。しかし、本研究により、P-セレクトイン上のアミノ酸76から83番の“WADNEPNN”がPSGL-1上の硫酸化チロシンなどのコアタンパクを認識する新規機能エピトープである可能性が示唆された。

本研究は学位に値するものと認める。