



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	https://hdl.handle.net/11094/40771
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ひろ 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-セレクチンと 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-セレクチ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-セレクチンは、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-セレクチ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-セレクチンとPSGL-1との結合には、PSGL-1がsLe^x様糖錯構造を持ち、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-セレクチン上の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-セレクチ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-セレクチ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-セレクチン（ラットP-セレクチン-IgG）あるいはP-セレクチ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-セレクチ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-セレクチン-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-セレクチン中和抗体はいずれもP-セレクチンとsLe^x糖鎖との結合を阻害することが知られている。そこで、P-セレクチン-IgGとsLe^x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-セレクチンとsLe^x糖鎖との結合を阻害しなかった。従ってC215抗体はP-セレクチンとsLe^x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-セレクチ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-セレクチンのアミノ酸番号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-セレクチン-IgGとsLe^x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-セレクチンと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-セレクチンとsLe^x糖鎖との結合は阻害しなかった。以上から、WADNEPNNはP-セレクチ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-セレクチンとPSGL-1との結合は阻害するがsLe^x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-セレクチン上の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-セレクチンとPSGL-1の結合を特異的に阻害するがP-セレクチンとsLe^x糖鎖の結合は阻害しないという結果を得た。これまで、sLe^x糖鎖結合ドメインのみがP-セレクチ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-セレクチン上のアミノ酸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-セレクチンとPSGL-1との結合は阻害するがsLe^x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-セレクチン上の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-セレクチンとPSGL-1の結合を特異的に阻害するがP-セレクチンとsLe^x糖鎖の結合は阻害しないという結果を得た。これまで、sLe^x糖鎖結合ドメインのみがP-セレクチ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-セレクチン上のアミノ酸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。