



Title	CD9 Antigen Interacts with Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor through Its Heparin-Binding Domain
Author(s)	佐久間, 貴彦
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41030
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	佐 久 間 貴 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 5 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 3 月 9 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	CD9 Antigen Interacts with Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor through Its Heparin-Binding Domain (CD9 抗原は Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor のヘパリン結合領域に会合する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 岸 本 忠 三 教 授 中 村 敏 一

論 文 内 容 の 要 旨

[目的] Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor (HB-EGF) は EGF ファミリーに属する増殖因子でヘパリン/ヘパラン硫酸に対する結合能を持ち、その生理活性の発揮にはヘパリンの存在が必要である。一方 CD9 抗原も HB-EGF に会合しその生理活性を増強する。HB-EGF とヘパリンの会合は既に解析され HB-EGF のヘパリン結合領域も特定されているが、HB-EGF と CD9 抗原との会合は詳しく解明されていない。本研究では、1) 未だ不明の HB-EGF/CD9 抗原それぞれの会合部位を同定し、2) HB-EGF に対するヘパリン、CD9 抗原の会合のそれぞれのキネティクスを解析した。

[方法ならびに成績] HB-EGF は keratinocyte の autocrine 増殖因子でもあるが、その活性は同時に CD9 抗原が発現すると促進される。しかし keratinocyte に対して増殖活性を持つ他の EGF ファミリーの増殖因子のうち、CD9 抗原による増強はヘパリン結合能を持つものに限られる。このことからヘパリン結合領域が HB-EGF の CD9 抗原に対する相互作用の部位と示唆された。

これを確認するため、HB-EGF のヘパリン結合領域を構成する21アミノ酸長ペプチド (KRKKKGKGLGKKRDP-CLRKYK : P21-ペプチド) をプレートに固相化し、これに対する CD9 抗原発現細胞の接着を調べた。ヘパラン硫酸を持つ野生型細胞 (CHO K1) は P21-ペプチドを固相化したプレートに接着する一方、ヘパラン硫酸を欠如した突然変異型細胞 (CHO pgsD-677) は接着しなかった。CD9 抗原 cDNA を CHO pgsD-677 細胞に導入発現させると、P21-ペプチドを固相化したプレートに対する接着能を回復した。さらにその際ヘパリンが同時に存在すると、細胞の接着は濃度依存性に阻害された。このことから、CD9 抗原は HB-EGF のヘパリン結合領域に会合すること、および CD9 抗原の HB-EGF に対する結合部位は細胞外ドメインにあることが示された。

次に CD9 抗原の細胞外ドメインの中の HB-EGF に対する結合部位を決定するために以下の実験を行った。細胞外ドメインを構成する領域から、20アミノ酸の長さで互いに10アミノ酸づつ overlap するように 8 つのペプチドを合成し、この中から P21-ペプチドに対する相互作用を示すものがあるかを、表面プラズモン共鳴により検討した。その結果 ¹¹⁹VIKEVQEFYKDTYNKLTKD¹³⁸ の領域が、HB-EGF のヘパリン結合領域と会合する部位であることが明ら

かとなった。

さらにこれを確認するため、センサーチップに固相化した P21-ペプチドに対して ^{119}V -D¹³⁸-ペプチドとヘパリンを順次連続して流し、表面プラズモン共鳴により p21-ペプチドとの結合を解析した。その結果両者の間に競合が認められ、HB-EGF のヘパリン結合領域がヘパリン/ヘパラン硫酸と CD9 抗原が共通して結合する部位であることを明らかにした。

表面プラズモン共鳴により求めたヘパリン/P21-ペプチド間の解離・結合定数は $k_d = (2.72 \pm 0.15) \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$, $k_a = (9.65 \pm 0.53) \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_b = (2.82 \pm 0.10) \times 10^{-8} \text{M}$ であった。一方 P21-ペプチド/ ^{119}V -D¹³⁸-ペプチド間の結合・解離定数は、 $k_d = (2.53 \pm 0.33) \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, $k_a = (6.82 \pm 0.89) \times 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_b = (3.71 \pm 0.71) \times 10^{-6} \text{M}$ であった。HB-EGF のヘパリン結合領域は、ヘパリン/CD9 抗原が共通に会合する部位ではあるが、解離・結合定数には差異が認められることから、HB-EGF がヘパリン、CD9 抗原により修飾される機構はそれぞれ異なる可能性が示唆された。

[総括] HB-EGF と CD9 抗原が会合することを panning および表面プラズモン共鳴により明らかにした。さらに両者の結合部位はそれぞれ、HB-EGF はヘパリン結合領域であること、CD9 抗原は細胞外ドメインの中の $^{119}\text{VIKEVQEFYKDTYNKLTKD}^{138}$ 領域であることを見出した。すなわち、HB-EGF のヘパリン結合領域はヘパリン/ヘパラン硫酸のみならず CD9 抗原に対する結合部位でもあることが示された。さらに HB-EGF のヘパリン結合領域とヘパリン、CD9 抗原との会合のキネティクスを初めて解析した。

論文審査の結果の要旨

Heparin Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) は soluble form に加え膜結合型 (pro HB-EGF) も増殖因子活性を示す。CD9 抗原は proHB-EGF と会合することによりヒトケラチノサイトの増殖や動脈硬化巣における平滑筋細胞の増殖のコファクターとして proHB-EGF の活性を増強することが知られているが、結合部位等その会合の詳細は明らかではない。

申請者は、HB-EGF と CD9 抗原の相互作用を、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを持つ野生型の CHO 細胞とこれを欠損する突然変異型細胞を用いた panning、及び合成ペプチドを用いた表面プラズモン共鳴法により解析した。その結果、1. HB-EGF と CD9 抗原が結合することを確認し、その結合部位はそれぞれ HB-EGF のヘパリン結合領域と CD9 抗原の細胞外ドメインの $^{119}\text{VIKEVQEFYK DTYNKLTKD}^{133}$ の領域であることを見出した。すなわち、HB-EGF のヘパリン結合領域はヘパリンのみならず CD9 抗原に対する結合部位でもあることを示した。2. 表面プラズモン共鳴により相互作用のキネティクスを解析し、HB-EGF とヘパリン ($k_b = [2.82 \pm 0.10] \times 10^{-8} \text{M}$)、HB-EGF と CD9 抗原 ($k_b = [3.71 \pm 0.71] \times 10^{-6} \text{M}$) それぞれの間の結合定数を求めた。従来、ヘパリンの他に CD9 抗原も HB-EGF と結合しその増殖因子機能を修飾することが知られていたが、その結合は詳しく解析されていなかった。本研究によりその機構の一端が明らかとなったので、これは学位論文に値すると思われる。