

フィブリノゲン異常症および欠損症の
検出とその分子生物学的解析

— 4例の異常フィブリノゲンMatsumotoの
遺伝子検査と機能解析および生成異常の証明 —

2000年3月

寺澤 文子

目 次

緒 論	1
本 論	
第1章 フィブリノゲンとその異常症の検査法	
第1節 フィブリノゲンの構造と機能	3
第2節 フィブリノゲン異常症	6
第3節 フィブリノゲンのタンパク解析と遺伝子解析	
第1項 凝固スクリーニング検査	8
第2項 SDS-PAGEとWestern blotting による A α , B β , γ 鎖の 観察	9
第3項 フィブリノペプチドAとフィブリノペプチドBの放出能	9
第4項 遺伝子解析	
1. DNAの抽出	10
2. PCRによるDNAの増幅	11
3. DNA塩基配列の解析	11
4. DNAのサブクローニング	12
5. 制限酵素によるPCR産物の切断	12
第5項 Thrombin-catalyzed fibrin polymerization (TCFP) 試験	
1. フィブリノゲンの精製	14
2. TCFP試験の反応条件	14
第2章 3例のフィブリノゲン異常症の構造異常と機能異常の解析	
1. 緒 論	15
2. 症 例	15
3. 凝固スクリーニング検査結果	15
4. SDS-PAGEとWestern blotting による観察	16
5. フィブリノペプチドAとフィブリノペプチドBの放出能	19
6. DNA塩基配列および制限酵素処理	19
7. TCFP 試験の比較	22
8. 考 察	28

第3章 フィブリノゲン欠損症における原因の解明

第1節 Fibrinogen Matsumoto IVの発見

1. 緒言	33
2. 症例	33
3. 凝固スクリーニング検査結果	34
4. SDS・PAGEとWestern blottingによる観察	34
5. 遺伝子解析	34
6. 考察	37

第2節 異常フィブリノゲンの作製と欠損原因の解明

第1項 異常フィブリノゲンの発現

1. 緒言	38
2. 材料および方法	38
3. 結果	47
4. 考察	49

第2項 異常フィブリノゲン (Fibrinogen Matsumoto IV) の細胞内における動態解析

1. Pulse - chase analysis	
1) 緒言	53
2) 材料および方法	53
3) 結果	55
2. mRNA量の半定量的・RT-PCR	
1) 緒言	56
2) 方法	60
3) 結果	60
3. 考察	62

総括	65
謝辞	69
関係論文	71
参考文献	72

緒 論

緒 論

フィブリノゲンは、肝臓で生成され血液中に放出される糖タンパクで、生体の防御機構のひとつである止血反応の最終段階で機能する血液凝固系第 I 因子である。複雑な血液凝固カスケードの最終段階においてトロンビンの作用によりフィブリンに変化し、つづいて第 XIII 因子により安定化フィブリンとなり、血液凝固を完結させる。さらに血小板膜糖タンパクやフィブロネクチンなどの血漿タンパクとさまざまな様式で結合し、その多岐にわたる機能により止血および創傷治癒に寄与している。フィブリノゲンは A α , B β , γ の 3 本のポリペプチド鎖が S-S 結合したものが、さらに 2 量体をなしている分子量 340kDa の巨大なタンパクで、1 分子の中に 58 個のシステインをもち、29 個の S-S 結合がある。フィブリノゲンの血漿中濃度は 1.50-3.00g/L である。フィブリノゲンに関する先天性の疾患にはフィブリノゲン異常症、無フィブリノゲン血症、低フィブリノゲン血症などがある。多様なフィブリノゲンの機能のうちそのいずれかが遺伝性の、一次構造の異常により障害されているものを、フィブリノゲン異常症という。タンパク分析あるいは遺伝子解析により、構造異常が明らかにされたものは、現在までに全世界で 110 家系以上の報告がある。それらの異常フィブリノゲンは、血漿中にタンパク量としては正常量あるものの、活性は著しく低下しているのが特徴である。一方、先天性の無フィブリノゲン血症 (欠損症) は血漿中のフィブリノゲンがタンパクとして存在しないもの、低フィブリノゲン血症は血漿中濃度の著しい低値を示すものをいう。

私は、信州大学医学部附属病院において、血液凝固検査の結果から機能異常を疑う 3 例と、欠損症の可能性を示す 1 例を見出し、それらの機能検査および遺伝子解析の結果、それぞれが 1 塩基置換による 1 アミノ酸変異による異常症であることを確認し、Fibrinogen Matsumoto I, II, III, IV として報告した。

Fibrinogen Matsumoto I, II, III は、遺伝子解析の結果、それぞれが γ 鎖の変異であり、Fibrinogen Matsumoto I は γ 鎖 364 残基アスパラギン酸 (GAT) がヒスチジン (CAT) に、Fibrinogen Matsumoto II は γ 鎖 308 残基アスパラギン (AAT) がリジン (AAG) に、Fibrinogen Matsumoto III は γ 鎖 275 残基アルギニン (CGC) がシステイン (TGC) に変異していた。このような 1 アミノ酸置換の構造異常をもつ 3 例について

thrombin-catalyzed fibrin polymerization試験による機能解析を行ない、フィブリノゲン分子中のアミノ酸変異部位と機能異常のタイプ、あるいは程度について検討した。

一方、Fibrinogen Matsumoto IVは、 γ 鎖153残基がシステイン (TGT) からアルギニン (CGT) へ変異したヘテロ接合体であったが、この変異により γ 鎖153システインと、同じ γ 鎖上にある182システインとの間のS-S結合は形成されないことになり、したがってこの変異をもつ γ 鎖は、著しい三次構造の変化を伴うことが推察された。このような構造異常が欠損を招く原因としては、細胞内でのフィブリノゲンの組み立てが障害されているか、あるいは細胞内または血液中で異常フィブリノゲンの破壊が亢進していることなどが考えられた。またプロモーター領域の異常、スプライシングエラーなども生成不良の原因となることから、それらの検索も必要であったが、フィブリノゲンは肝細胞においてのみ生成され血液中に放出されるために、この患者のmRNAを得ることはできなかった。そこで、正常 γ 鎖cDNAを含むプラスミドを用いて、 γ 鎖153システインがFibrinogen Matsumoto IVと同じ変異であるアルギニンと、別のタイプのアミノ酸であるアラニンに変化するような変異プラスミドを作製した。これらを正常A α 鎖、B β 鎖を産生している哺乳動物細胞 (chinese hamster ovary cells, CHO細胞) に導入し、異常フィブリノゲンを発現させた。また、対照として正常フィブリノゲン γ 鎖を発現するプラスミドについても同様に行なった。それらの培養液中および細胞内のフィブリノゲン濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定するとともに、SDS-PAGEとWestern blottingによる各鎖の観察を行った。さらに、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンを用いたpulse-chase analysisを行ない、細胞内において3種類のポリペプチド鎖およびそれらから生成されるフィブリノゲンが、どのような形で存在し、どのような動態を示すのかを観察した。以上の実験により得られた結果から、Fibrinogen Matsumoto IVの欠損の原因を解明した。

第 1 章

フィブリノゲンとその異常症の検査法

第 1 章

フィブリノゲンとその異常症の検査法

第 1 節 フィブリノゲンの構造と機能

フィブリノゲン (Fibrinogen) は、生体の防御機構のひとつである止血反応の最終段階で機能する糖タンパクであり、血液凝固第 I 因子と呼ばれている。フィブリノゲンは $A\alpha$ -、 $B\beta$ -、 γ 鎖と呼ばれる 3 種類のポリペプチド鎖がジスルフィド結合 (S-S 結合) したもの ($A\alpha$ - $B\beta$ - γ) が、さらに S-S 結合で 2 量体を形成し ($A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂ と表現される分子量 340 kDa の巨大な繊維状タンパクで、1 分子の中に 29 個の S-S 結合を有している^{1,2)}(Fig. 1, 2)。アミノ酸残基は $A\alpha$ 鎖が 625 個 (67kDa)、 $B\beta$ 鎖が 461 個 (56kDa)、 γ 鎖が 411 個 (47.5kDa) であり、肝細胞で合成され血流中に放出される。フィブリノゲンの血漿中濃度は 1.50-3.00 g/L とされている。止血反応における血液凝固機序には第 I 因子から第 XIII 因子までの因子のほかに種々の促進因子や抑制因子が関与しており、それらが複雑なカスケードを形成して完結する^{3, 4)}。その過程の最終段階において、フィブリノゲンは第 II 因子であるプロトロンビンから活性化されたトロンビンの作用により、まず $A\alpha$ 鎖アミノ基末端 (N 末端) の 1 から 16 番目までの 16 個のアミノ酸が切断されて、フィブリノペプチド A (fibrinopeptide A, FPA) として放出され、中間体 (desA フィブリン) となる。ついで $B\beta$ 鎖 N 末端の 1 から 14 番目までの 14 個のアミノ酸が切断されて、フィブリノペプチド B (fibrinopeptide B, FPB) として放出され、フィブリンモノマー [desAB フィブリン, (α - β - γ)₂] となる。このフィブリンモノマーは互いに規則的に重合して二本鎖らせん状の protofibril を形成する。やがてこれらが太い束となり分岐して、不安定フィブリン繊維となり流動性を失ってゲル化する (Fig. 3)⁵⁾。さらにこのフィブリンは活性型第 XIII 因子による γ 鎖- γ 鎖間、あるいは α 鎖- α 鎖間の共有結合 (架橋) を介して安定フィブリンを形成する。このような機能に加えて、フィブリノゲンは血小板膜タンパク IIb IIIa やプラスミノゲン、あるいは α 2-プラスミンインヒビター、フィブロネクチンなど種々の血漿タンパクとも様々な様式で結合し、止血ばかりでなく創傷治癒にも寄与している³⁻⁵⁾。

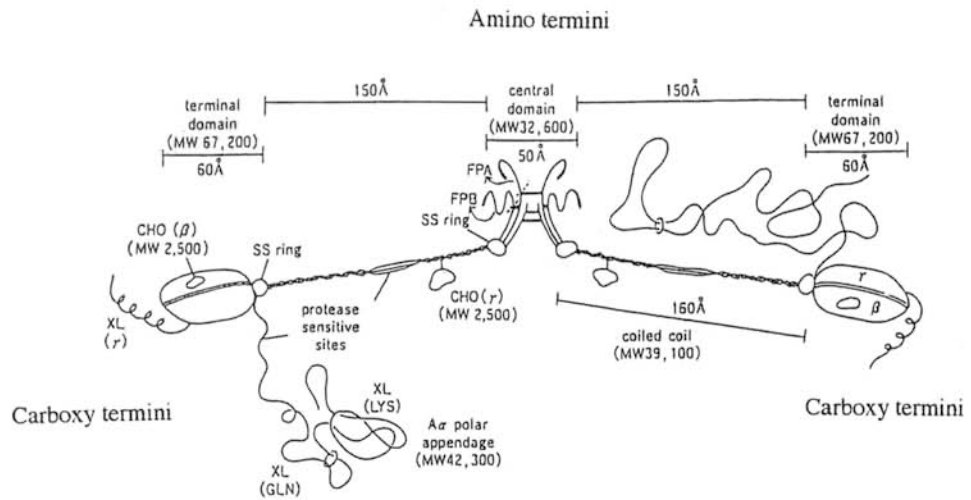


Fig. 1 Schematic representation of the fibrinogen molecule. Three different amino acids were found to be linked to amino (NH₂) groups, which define one end of a protein chain, and there were two copies each "end group". Breakage of the interchain disulfide bonds led to three different chains: α , β , and γ -chain, whose total molecular weight is 170 kDa. The molecular weight is accounted for half of the weight of the molecule, thus there are two copies of each chain.

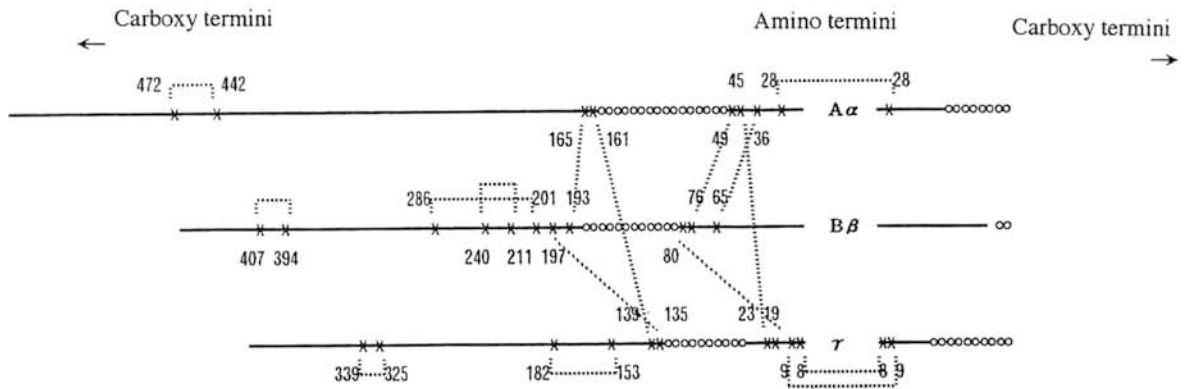


Fig. 2 Proposed arrangement of disulfide bonds in human fibrinogen. Numbers and "x" represent cysteine residues; broken lines represent disulfide bonds. Carboxy terminal domain of the half molecule was omitted. oooooo ; coiled coil regions of A α -, B β - and γ -chains.

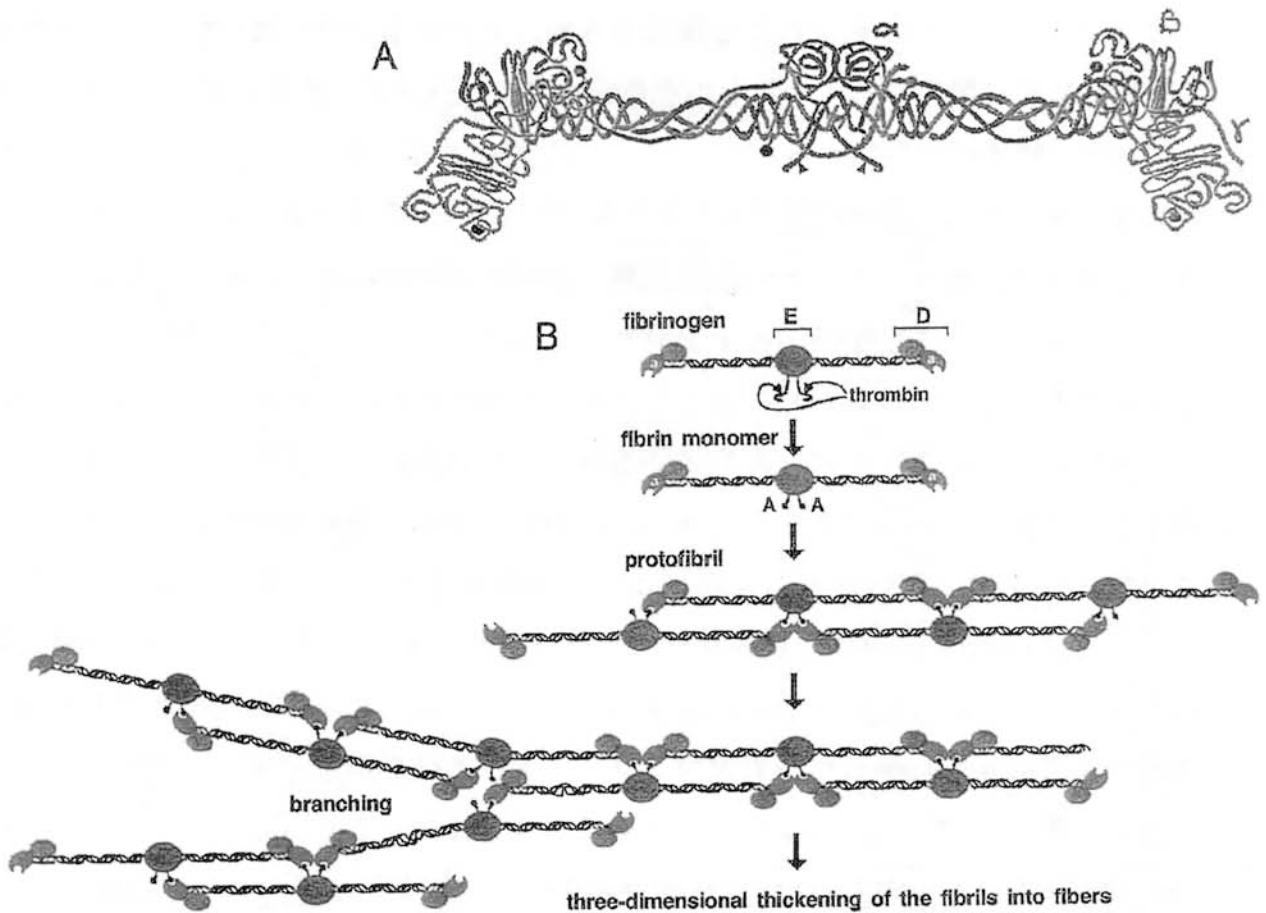


Fig. 3 Schematic representation of human fibrinogen. The α chain is shown in blue, the β chain in green, and the γ chain in red. The black arrowheads indicate thrombin cleavage sites on the α chain. Glycosylation sites are shown as purple hexagons, while the calcium ions within the γ chains are represented as purple spheres (A). Schematic diagram showing the initial process of fibrin polymerization. The central nodules contain the amino-termini of all six chains (α - β - γ)₂ and are referred to as the "E" regions, named after a fragment obtained by limited plasmin digestion of fibrin. They are flanked by two symmetric coiled coils that terminate in the distal "D" nodules. After the cleavage of fibrinopeptide A by thrombin, the newly exposed polymerization site "A" binds to the polymerization pocket "a" that is part of the γ chain of fibrin(ogen). The fibrin monomers thus align in a half-staggered, two-stranded arrangement to form long fibrils. Branch points and junctions occur sporadically (only one type is depicted here), contributing to the formation of a three-dimensional mesh (B). (from Ref. 5)

第2節 フィブリノゲン異常症

フィブリノゲンの多岐にわたる機能のうち、そのいずれかが遺伝性の、一次構造の異常のために障害されているものを遺伝性フィブリノゲン異常症(以下、単にフィブリノゲン異常症と表現する)という。しかし現在までの報告例は、すべてフィブリンの重合障害を招く異常に関するもののみであり⁶⁻⁹⁾、多様な機能をもつフィブリノゲンと種々の血漿タンパクとの相互作用に関わる異常例は報告されていない。フィブリノゲン異常症は1958年 Imperato¹⁰⁾らにより、フィブリノゲンの低値とフィブリン塊の形成不全がみられた症例として初めて報告された。それ以来、現在までに300を越えるフィブリノゲン異常症が報告されているが、フィブリノゲンは血漿中濃度が血液凝固系タンパク中最も高いことから、アミノ酸分析や高速液体クロマトグラフィーを用いたペプチド分析により一次構造の異常が証明されるようになった。さらに1980年代半ばには各ポリペプチド鎖のcDNAおよびゲノムDNAの構造解析も完了し¹¹⁾、polymerase chain reaction (PCR)の応用、ならびにDNA塩基配列解析技術や装置の発展に伴って、異常フィブリノゲンの変異部位が次々と明らかになってきた。現在までにタンパク分析あるいは遺伝子解析により、フィブリノゲンの構造異常が明かにされたものは約110家系報告されている⁹⁾。このうち、A α 鎖とB β 鎖に構造異常を有するものはFPA、FPBの放出異常を来たす変異によるものと、放出後のペプチドのN末端に変異が存在するものが多い。これらはトロンビンによるFPAまたはFPBの放出が障害され遅延することにより、あるいはフィブリンモノマーからのprotofibril形成が遅延することにより、フィブリン凝集に遅延を来たす。A α 鎖では16番アルギニン(Arg)、17番グルタミン(Glu)、18番プロリン(Pro)、19番アルギニン(Arg)などに変異を有する報告が見られ、B β 鎖では、14番Arg、15番Gluなどに変異を有する報告が多く見られる¹²⁾。一方、 γ 鎖に構造異常を有するものでは、268番アミノ酸より380アミノ酸までのC末端側の変異が報告されており、275番Arg、308番アスパラギン(Asn)、330番アスパラギン酸(Asp)などでは複数例の報告がみられている(Table 1)⁵⁾。このような異常フィブリノゲンは、変異されたアミノ酸残基の位置、あるいは変異したアミノ酸残基の性状によりさまざまな程度のフィブリン凝集異常を示す。現在までに報告されている遺伝性のフィブリノゲン異常症は、タンパクとしてのフィブリノゲンは血液中に正常量存在するものの、機能異常を呈

Table 1. Summary of γ -Dysfibrinogens

Mutation	Name	Sex/ Age	Ca ²⁺ - Binding	γ - γ FXIIIa- Crosslinking		Hetero/ homo- zygous	Clinical Symptoms (no. of episodes)	Relative(s)	References
				Fibrin	Ibg				
G268E	Kurashiki I	M/58		N	A	HM	ASYMPT		101
R275C	Baltimore IV	M/56		N		HT	ASYMPT		116, 117
	Bologna I	F/20					THROMB	2	84
	Cedar Rapids I					HT	THROMB(2)*	2†	122
	Milano V	F/51	N			HT	ASYMPT		119, 199
	Morioka I			N		HT	ASYMPT		115
	Osaka II	M/48		N		HT	ASYMPT		113
	Tochigi I	M/51		N		HT	ASYMPT		88, 114
	Tokyo II	F/39		N		HT	ASYMPT		100, 118
	Villajoyosa I	F/27				HT	ASYMPT		120
	R275H	Barcelona III	M/71				HT	THROMB(1)	0
Barcelona IV		M/28				HT	ASYMPT		120
Bergamo II		F				HT	THROMB(M)	5	126
Claro I		F/42	N			HT	ASYMPT‡		128, 199
Essen I		M				HT	ASYMPT		126
Haifa I		F/30	N	N		HT	THROMB(\geq 2)	1	95, 130, 131
Osaka III		F/38	N	N		HT	ASYMPT		127
Perugia I		M/2				HT	ASYMPT		126
Saga I		F/16	N			HT	ASYMPT		129
G292V		Baltimore I	F/29		N		HT	THROMB(M)§	
N308I	Baltimore III	F/30		N		HT	ASYMPT		140, 141
N308K	Bicêtre II	M/40					THROMB(\geq 2)	0	144
	Kyoto I	M/45	N	N		HT	ASYMPT		142, 143
	Matsumoto II	F/49				HT	BLEED	1	145
M310T	Asahi I	M/33		A	A	HT	BLEED(M)		146, 147
D318G	Giessen IV	F/18					THROMB*§¶	0	84
Δ N319,D320	Vlissingen I	F/23	A			HT	THROMB	\geq 6	152
Q329R	Nagoya I	F/43		N		HT	ASYMPT		153-155
D330V	Milano I		N	N		HT	ASYMPT		156, 199
D330Y	Kyoto III	F/50				HT	ASYMPT		157
N337K	Barn I	F/24	N			HT	ASYMPT		158, 159, 199
∇ γ 350	Paris I		A	A					160-165
S358C	Milano VII	F/21	N			HT	ASYMPT		166, 199
D364H	Matsumoto I	M/1				HT	ASYMPT		167
D364 V	Melun I	F/40				HT	THROMB(M)	8	168
R375G	Osaka V	F/44	A			HT	ASYMPT		172
K380N	Kaiserslautern I			N		HM	THROMB		177

All propositi were found to have impaired fibrin polymerization and normal fibrinopeptide release. The number of episodes is shown in parentheses, if reported. Relatives refers to the number of relatives showing clinical symptoms similar to those of the propositus (but not necessarily the dysfibrinogenemia). Blanks indicate that data were unavailable or not found.

Abbreviations: M, male; F, female; N, normal; A, abnormal; fbg, fibrinogen; HT, heterozygous; HM, homozygous; ASYMPT, asymptomatic; THROMB, thrombosis; BLEED, bleeding; M, multiple.

*The propositus was also found to be heterozygous for the factor V Leiden defect.

†All affected relatives were heterozygous for both the dysfibrinogenemia and the factor V Leiden defect.

‡Had two spontaneous abortions.

§Also suffered from mild bleeding.

||Easy bruising and postpartum bleeding.

¶Personal communication from Drs F. Haverkate and R.M. Bartina, December 1997.

(from Ref. 5)

する症例に関するものである。

一方、タンパクとしてのフィブリノゲン自体が血液中に存在しない無フィブリノゲン血症 (フィブリノゲン欠損症) に関する報告は1920年¹³⁾にはじめて記載されて以来、現在までに150を超える報告がみられている¹⁴⁾。また低フィブリノゲン血症については1935年¹⁵⁾以来、約40例の報告がある¹⁶⁾。しかし、先天性の無フィブリノゲン血症や低フィブリノゲン血症に関する遺伝子解析は、1999年になって唯一1例が報告されただけである¹⁷⁾。

フィブリノゲンのほかに、血液凝固系、およびその溶解過程である線維素溶解 (線溶) 系関連タンパクとしては、プロテインC¹⁸⁾、プロテインS¹⁹⁾、アンチトロンビンIII²⁰⁾、第VII因子²¹⁾などほとんどすべての因子において、機能異常症、構造異常症、あるいは欠損症に関する報告が多数みられ、その多くのものにおいて遺伝子解析がなされている。

第3節 フィブリノゲンのタンパク解析と遺伝子解析

第1項 血液凝固スクリーニング検査

血液凝固系のスクリーニング検査として一般的に実施される項目のプロトロンビン時間 (prothrombin time, PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time, APTT)、フィブリノゲンの定量を実施した。これらの検査には、抗凝固剤である3.2%クエン酸ナトリウム量が1に対して血液量が9となるように採血し混和した後、3,000 rpm 10分間遠心分離して得た血漿を用いた。

1) プロトロンビン時間 (PT) : 被検血漿に、終濃度8.3 mMのカルシウムイオンとウサギ脳由来トロンボプラスチン (完全トロンボプラスチン, 東亜医用電子) を添加してフィブリンが析出するまでの時間を東亜医用電子CA-5000で測定した。主として外因系凝固能を反映し、正常値 (参照値) は10.0-12.0秒である。

2) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) : 被検血漿に、終濃度8.3 mMのカルシウムイオンと、ウサギ脳由来セファリン (部分トロンボプラスチンまたは不完全トロンボプラスチン, 東亜医用電子) とその活性化剤であるエラジン酸を添加したAPTT試薬を加え、フィブリンが析出するまでの時間を東亜医用電子CA-5000で測定した。主として内因系凝固能を反映し、正常値 (参照値) は24.0-37.0秒である。

3) フィブリノゲンの定量:

a) 機能的な定量法 (トロンビン時間法) ; 0.031 Mペロナール緩衝液 (pH 7.35) で10倍希釈した血漿に, ウシトロンビン (東亜医用子) を終濃度33 U/mLとなるように添加し, フィブリノゲンがフィブリンとなり, 析出するまでの時間を東亜医用電子CA-5000で測定し, 標準直線からフィブリノゲンを算出した.

b) フィブリノゲンタンパク量の定量法 (免疫法) ; 抗ヒトフィブリノゲン抗体感作ラテックス粒子を用いて, フィブリノゲンタンパク量を抗原量として定量した. 自動ラテックス光学的免疫測定装置 (ダイアヤトロンL-100) により測定した²²⁾. 正常値 (参照値) はいずれの方法においても1.50-3.00 g/Lである.

第2項 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis) と Western blotting によるA α , B β , γ 鎖の観察

発端者および正常血漿を100倍希釈し, 2% SDS と5% 2-メルカプトエタノールによる還元下で10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し, それをニトロセルロース膜に転写した. 5%スキムミルクでブロッキングした後, Matsumoto I, II, IIIには一次抗体として抗ヒトフィブリノゲンウサギ抗体 (Medical Biological Laboratory, MBL) を100倍希釈したもの, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体 (MBL) を100倍希釈したものを用い, 発色は0.05 M Tris-HCl緩衝液 pH 7.6の50 mLに, 3, 3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩 12.5 mgとH₂O₂ 15 μ Lを添加した溶液で行なった²³⁾. また, Matsumoto IVおよびフィブリノゲンを発現させた細胞の抽出液と培養上清中の場合には, さらに鋭敏な検出方法として, 一次抗体として抗ヒトフィブリノゲンウサギ抗体 (DAKO) を100倍希釈したもの, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体 (Pierce) を1,000倍希釈したものを用い, 発色は10 mM MgCl₂ 添加 0.1 M Tris-HCl緩衝液, pH 9.5の15 mLに5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Sigma) 2.5 mg, ニトロブルーテトラゾリウム(NBT, 和光純薬) 5 mgを添加した溶液で行なった²⁴⁾.

第3項 フィブリノペプチドA, フィブリノペプチドBの放出能

血漿 5 mLに 2 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 10 KIU/mLアプロチニンを含む50 mM

Tris-HCl緩衝液, pH 7.4を15 mL加えた. これに25%飽和になるように硫酸アンモニウム2.88gを加えて泡立てないように攪拌し, フィブリノゲンを塩析した²⁵⁾. 15,000 rpmで30分間遠心し, 得られた沈殿物を25%硫酸アンモニウムで2回洗浄した. これを2 mLの0.3 M NaClに溶解し, 同液に対して4℃で透析した. 15,000 rpm 10分間遠心後, 上清を採り, 0.15 Mの酢酸アンモニウム, pH 8.5に対して4℃で透析し, フィブリノゲン濃度が1 mg/mLとなるように同液で希釈した. その溶液1 mLに, 0.2 NIH U/mLウシトロンビンを添加し, 37℃でそれぞれ1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 120分間と16時間反応したものを各1本ずつ準備した. トロンビンの酵素反応を, 煮沸水浴中に1分間置くことにより停止させた後, 全量を500 μ Lのマイクロチューブに移し, 15,000 rpm10分間遠心した. 沈殿中のフィブリン網と未反応のフィブリノゲン熱凝集物を除去し, 上清を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC, Shimadzu LC-5A) により分離した. カラムは, 逆相クロマトグラフィー用のCOSMOSIL 5C18P (ナカライタスク) を用いた. HPLC分析の条件は, A液; 0.025 M 酢酸アンモニウム pH 6.0, B液; HPLC用アセトニトリルと0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 6.0の等量混液とし, A液に対してB液を12-28%の直線グラジエントで30分間, 流速 1.0 mL/minで実施した. 試料は0.45 μ mのフィルターを通過させた後, 100 μ Lをインジェクトし, CR-3A Chromatopac (Shimadzu)を用いて210 nmでペプチドを検出し, ピーク面積を解析した. 各時間の放出量は, 正常血漿から精製したフィブリノゲンをトロンビンと16時間反応させたものの放出量を100%として, %放出量で表現した²⁶⁾.

第4項 遺伝子解析

1. DNAの抽出

末梢血から抽出したDNAを用いてA α , B β , γ の3本鎖の全エクソンおよびエクソン-イントロン結合部の塩基配列を解析した. 全血より血漿を採取した残りの血球部分500 μ Lに cell membrane lysis buffer (0.32 M Sucrose, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 12 mM Tris-HCl緩衝液 pH7.6) 900 μ Lを加えてよく攪拌し白血球を破壊した. 12,000 rpm 5分間遠心し上清を取り除く操作を2回繰り返した後, nuclear membrane lysis buffer (4 M Guanidine thiocyanate, 12 mM EDTA, 375 mM NaCl, 17mM

Sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.1 M 2-Mercaptoethanol, 12 mM Tris-HCl緩衝液 pH7.6) 500 μ Lを加えて混和し, 細胞核膜を破壊した. これにイソプロパノール 400 μ Lを加えてDNAを析出させた. 12,000 rpm 5 間分遠心し, 80% エタノールで洗浄した後, 乾燥し, 300 μ LのTris-Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) 緩衝液 pH 8.0に溶解し, 260 nmにおける吸光度からDNA濃度を測定した.

2. PCRによるDNAの増幅

PCRに使用するプライマーは, A α 鎖に4組, B β 鎖に5組, γ 鎖に6組, および A α 鎖のエクソンVの塩基配列解析に必要な2本の計32本を設計した (Table 2). 25 μ LのPCR反応液は, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.4, 1.5 mM MgCl₂ 中に1 μ gのDNA, それぞれ0.2 μ Mのforwardとreverse primer, それぞれ200 μ MのdATP, dTTP, dCTP, dGTP (Idaho Technology), 0.6 U Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, またはFermentas) を含む. PCRはDNAサーマルサイクラー PC-800 (Astec) を用いて30サイクル増幅した. 反応条件はdenaturation 94 $^{\circ}$ C 1分, annealing 50–59 $^{\circ}$ C 1分, extension 72 $^{\circ}$ C 1分を基本とした. PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドにより染色した. 目的のDNAバンドをアガロースから切り出し, GeneClean II (Bio 101) で精製して, DNA塩基配列解析用の鋳型DNAとした.

3. DNA塩基配列の解析

DNA塩基配列の解析は, Dye Deoxy Terminator法 (Applied Biosystems Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) により行った. 50–300 ngの鋳型DNAに対し, 約0.2 μ Mのforward primerあるいはreverse primerを用い, シークエンス反応はdenaturation 96 $^{\circ}$ C 30秒, annealing 50 $^{\circ}$ C 15秒, extension 72 $^{\circ}$ C 4分の条件で25サイクル行った. 反応産物は3 M酢酸ナトリウムを1/25量加えた冷97%エタノールで精製し, 80%エタノールで洗浄し乾燥して, 電気泳動直前に EDTA 1 μ Lとホルムアミド5 μ Lに溶解した. 50%尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを支持体として電気泳動し, ABI社製の373A DNA sequencerを用いてDNA塩基配列の解析を行った.

4. DNAのサブクローニング

Matsumoto I, IIでは異常配列を含むPCR産物を, TA Cloning System (Invitrogen) を用いてサブクローニングした. 10×ligation buffer 1 μLに10–50 ngのPCR産物と25 ngの pCRTM ベクター, 1 μL (4–6 U) のT4 DNA ligaseを加え水で11 μLとし, 14℃に4時間置いて ligationした. 次に50 μLの competent *E.coli* cellにligation溶液を1–2μL加え, 氷中に30分間置き, ついで42℃に30–45秒間置いてPCR産物をpCRTM ベクターに導入した. これに250 μLのSOC溶液を加え, 37℃で1時間, 180 rpmで振とうしながら培養した. 10分間氷中に置いた後, 表面に40 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-gal) を25 μL塗布した, 50 μg/mLアンピシリンを含む10 cm LB寒天培地に接種した. 37℃で1晩培養した後, 白色コロニーを釣菌し, 2.5 mLのLBブロス培地で一晩振とう培養した. 培養したLBブロスから1.5 mLをマイクロチューブにとり, 8,000 rpmで遠心し, 沈殿物に100 μLのグルコース添加 Tris-EDTAと200 μLのアルカリ性SDS溶液を加えてよく混和した. さらに150 μLの酢酸カリウムと450 μLの5 M 塩化リチウムを加えて混和した後, 14,000 rpmで10分間遠心した. 上清を採取し, 600 μLイソプロパノールを加えて14,000 rpm10分間遠心し, プラスミドDNAを抽出した. RNase 0.5 μgを含むTris-EDTA緩衝液 (pH 8.0) の50 μLに溶解し, これを制限酵素*EcoRI*で切断し, アガロースで電気泳動して目的の塩基配列を含むDNA断片の長さであることを確認した. 得られたプラスミドDNAは, M-13-20プライマーを用いてシーケンスした.

5. 制限酵素によるPCR産物の切断

Matsumoto III では, γ 鎖エクソンVIII のPCR産物 (685塩基対) を制限酵素 *Sca I* (New England Biolaboratory) により処理した. Matsumoto IVでは, γ 鎖エクソンVIのPCR産物 (784塩基対) を制限酵素*Mbo I* (New England Biolaboratory) により処理した. まず20 μLの PCR産物に1.1 μLの3 M 酢酸ナトリウムと44 μLの冷エタノールを加え–20℃に一晩静置した. 沈降物を80%エタノールで洗浄した後, 10 μLの水に溶解し, 1.25 U *Sca I*または*Mbo I*を加えて37℃に4時間静置し, 完全に消化させた. 切断認識部位はそれぞれ*Sca I*; AGTACT, *Mbo I*; GATCである. 処理されたDNAは, 2%のアガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色後, 観察し

Table 2 Primers used for PCR amplification and sequencing of 3 fibrinogen polypeptide genes

Peptide and exon(s)	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')	Annealing temperature(°C)	PCR product(bp)
Aα				
I	GTC TAG GAG CCA GCC CCA CC	GTG TCA GGA CAT AGA GCA GG	59	180
II and III	GCC CTG TGT CTG CTC TCC TTA ATC	ACG AAA ACA AAA GCT CCC TC	56	1070
IV and V(1)	TTT GCT GGC AAT TAC AGA CA	CCT GGG GCT TTC CGT CTC TG*	56	1144
V(2)	AGA CCT GGT GGA AAT GAG ATT AC*	GTT AAG AAG GAA ATG CAA GGG	53	1206
V(3)	TGG CAC TCT GAA TCT GGA AG*#	CCC AGG GTG ATG AGA ACT GG*#		
Bβ				
I	GGA TGG TTT CTT GGA GC	GCT AAG CCA TCC TCA TCT	50	335
II and III	GAT TCA CTA TCA CCA ACC AGC CAG	CAT GCA TTC TCG TGG CAG TC	50	1088
IV and V	CTG CTT GGT GAT AGC TCA GT	CTG GCC TTG TTT CCT GGC AT	50	1078
VI and VII	GAA TGG ACA GGG GAT TCA GA	AAG TGC CCA GGA AGT GGT AG	50	808
VIII	GTG CAC ACG AGT GTA GCA GT	GAA CGC TTC TCC TTC CTT AC	50	842
γ				
I and II	GGA GCC TGA GAG GTG ACA GTG C	CCA GTT CAC ACA CAA AGG GAG AAA C	50	321
III and IV	TTT CTC TTT TAG TAT GTT GC	TCA ACA TAA TCA GGC ATA AT	50	779
V and VI	CTT ATT TTT GTC TTC TTA TT	TGT GCC TCA GTT TCC TTT TC	50	784
VII	ATT TTC TCC TTT TGC TCT TG	CCC AAG AAC CAA ACA GAC TC	50	372
VIII	AGA TCC CTG AGG AGG GTC AG	CTA AGA AAG GAA AAC ATA CC	50	347
IX and X	AGA CTT GCA GAG GTA AAA AG	GCT TTG CAA GTC CAT TGT CC	55	880

*Primer in exon, # Primer only for sequencing.

た.

第5項 Thrombin-catalyzed fibrin polymerization (TCFP) 試験

1. フィブリノゲンの精製

フィブリノゲンの精製は、IF-1 モノクローナル抗体 (抗フィブリノゲン抗体) を結合させたCNBr活性化Sephacrose 4Bを用い、イムノアフィニティクロマトグラフィーにより行なった²⁷⁾. 1 mMのカルシウムイオン存在下でカラムに吸着したフィブリノゲンを、5 mM EDTAを含む溶液で溶出した. ただし、Matsumoto I の精製においては、10 mM Caイオン存在下で吸着したフィブリノゲンを50 mM EDTAを含む溶液で溶出し、EDTAの影響を取り除くために、0.12 M NaClと1mM CaCl₂とを含む20 mM N- [2-hydroxyethyl] piperazine -N'- [2-ethanesulfonic acid] (HEPES), pH 7.4に透析し、その後すべてのフィブリノゲンは CaCl₂を含まない上記緩衝液に対して透析した²⁸⁾. フィブリノゲン濃度は320 nmにおける吸光度を対照として280 nmで測定した. 280 nmにおける吸光度1.51は、フィブリノゲン1.0 mg/mLに相当する²⁹⁾. 得られたフィブリノゲンはSDS-PAGEで純度および分解のないことを確認した後、使用するまで-80°Cで保存した.

2. TCFP試験の反応条件

Polymerization試験は350 nmにおける吸光度の経時的変化として、Shimadzu UV-110-02により測定した. 0.12 M NaClを含む20 mM HEPES, pH 7.4により0.2 mg/mLとなるように希釈したフィブリノゲン溶液90 μ Lに、0.5 U/mLのヒト α -トロンビン10 μ Lを加えてよく混和し、直ちに吸光度の経時的変化を記録した. 終濃度はフィブリノゲン 0.18 mg/mL, トロンビン 0.05 U/mLであった. また終濃度 0.01, 0.1, 1.0 mMとなるようにCaCl₂, または終濃度1 mMとなるようにEDTAを添加した緩衝液を用いて、フィブリン重合反応におけるカルシウムイオンの影響を検討した. 三重測定で計測した反応曲線において、重合開始までの時間 (lag time)と最大重合速度 (V_{max} , 重合反応曲線の最大吸光度変化率) により重合反応を評価した²⁸⁾.

第2章

3例のフィブリノゲン異常症の 構造異常と機能異常の解析

第 2 章

3 例のフィブリノゲン異常症の構造異常と機能異常の解析

1. 緒 論

1992年から1996年の5年間に日常検査で測定されたフィブリノゲン濃度 (機能的定量法) と免疫法によるフィブリノゲン濃度の間に乖離を認めたことから、フィブリノゲン異常症を疑う3症例を見いだした。3例について遺伝子解析を行なったところ、それぞれフィブリノゲンをコードしている遺伝子上に、アミノ酸の変異をもたらす1塩基の置換を認めた。さらにフィブリノゲンの機能検査を実施したところ、3例はともに、フィブリノゲン分子内の1アミノ酸置換により、フィブリン重合反応に障害をひきおこす異常症であることが明かになった。そこで、これらの3例を、Fibrinogen Matsumoto I, II, IIIと命名したので報告する。

2. 症 例

Fibrinogen Matsumoto I (以下M・I) の発端者は1才の男児で、先天的な心臓疾患を伴ったダウン症候群患者であった。その心臓疾患の術前凝固スクリーニング検査において、フィブリノゲンの著しい低値を認めた。母親および母親の弟 (叔父) に同様の異常が見られたが、いずれも出血症状などの既往は認められなかった。

Fibrinogen Matsumoto II (以下M・II) の発端者は49才の女性で、バセドウ病に対する放射線治療前の凝固スクリーニング検査の結果、フィブリノゲンの低値を指摘された。父親および次男に同様の異常がみられ、発端者と父親は出血症状の既往を有していた。

Fibrinogen Matsumoto III (以下M・III) の発端者は66才の女性で、大腸ガンの術前凝固スクリーニング検査において、フィブリノゲンの著しい低値が認められたが、出血、血栓傾向は認められなかった。

3. 凝固スクリーニング検査結果

M・Iでは、発端者、発端者の両親、叔父および健常者について行なった。発端者

の結果は、PT13.0秒 (正常値10.0-12.0秒), APTT29.4秒 (正常値24.0-37.0秒), フィブリノゲン量はトロンビン時間法で測定した場合0.16 g/L, 免疫法で測定した場合3.40 g/L (正常値1.50-3.00 g/L)であった。トロンビン時間法と免疫法によるフィブリノゲン量の濃度比 (以下フィブリノゲン濃度比) は0.047であった。母親も同様にそれぞれ14.1秒, 33.2秒, 0.21 g/L, 2.24 g/Lでありフィブリノゲン濃度比は0.094であった。また叔父も同じくそれぞれ13.8秒, 33.4秒, 0.36 g/L, 2.05 g/Lであり, フィブリノゲン濃度比は0.176であり発端者と同じ傾向の結果が得られたが, 父親はすべて正常範囲内であった (Table 3).

M・IIでは発端者, 発端者の両親, 夫, 長男, 次男, 三男, および健常者について行なった。発端者の結果は, PT12.2秒, APTT31.3秒, フィブリノゲン量はトロンビン時間法で0.67 g/L, 免疫法で2.46 g/L, フィブリノゲン濃度比は0.272であった。父親および次男にも同様の結果がみられ, 父親はそれぞれ13.1秒, 32.8秒, 0.57 g/L, 1.90 g/L, 0.300, 次男はそれぞれ13.3秒, 34.4秒, 0.52 g/L, 1.68 g/L, 0.310であったが, 母親, 夫, 長男, 三男はすべて正常範囲内であった (Table 4)。なお, 発端者の父親と母親は, 母方のいとこ結婚であった。

M・IIIの発端者の結果は, PT12.5秒, APTT21.1秒, フィブリノゲン量は, トロンビン時間法で0.39 g/L, 免疫法で2.91 g/L, フィブリノゲン濃度比は0.134であった。

4. SDS-PAGEとWestern blottingによる観察

血漿中フィブリノゲンのSDS-PAGEとWestern blottingによる観察を行なったところ, M・I, M・IIIの発端者では, 正常な場合と比べて, A α 鎖67 kDa, B β 鎖56 kDa, γ 鎖47.5 kDaの分子量, バンドの本数, および相対的な量など, いずれについても違いは認められなかった。一方, M・IIでは, A α 鎖, B β 鎖, γ 鎖の3本のバンドの他に, γ 鎖より低分子側に余剰のバンドが1本存在していた。そのバンドの分子量は γ 鎖よりおよそ1,800程度小さいものであり, 正常, M・I, M・IIIの γ 鎖と比較すると低濃度であった (Fig. 4)。

Table 3 Coagulation test results of the propositus and his kindred
(Fibrinogen Matsumoto I)

parameter	Propositus	Father	Mother	Maternal uncle	Normal range
PT (sec)	13.0	10.1	14.1	13.8	10.0-12.0
APTT (sec)	29.4	26.6	33.2	33.4	24.0-37.0
Fibrinogen (g/L)					
Thrombin time method	0.16	3.26	0.21	0.36	1.50-3.00
Immunologic method	3.04	4.20	2.24	2.05	1.50-3.00

Abbreviations: PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time

Table 4 Coagulation test results of the propositus and her kindred
(Fibrinogen Matsumoto II)

Parameter	Propositus	Father	Mother	Husband	First son	Second son	Third son	Normal range
PT (sec)	12.2	13.1	11.1	12.0	11.8	13.3	11.6	10.0-12.0
APTT (sec)	31.3	32.8	34.4	38.6	40.4	34.6	38.1	24.0-37.0
Fibrinogen (g/L)								
Thrombin time method	0.67	0.57	2.45	3.10	1.91	0.52	1.98	1.50-3.00
Immunologic method	2.46	1.90	2.96	3.34	2.00	1.68	2.26	1.50-3.00

Abbreviations: PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time

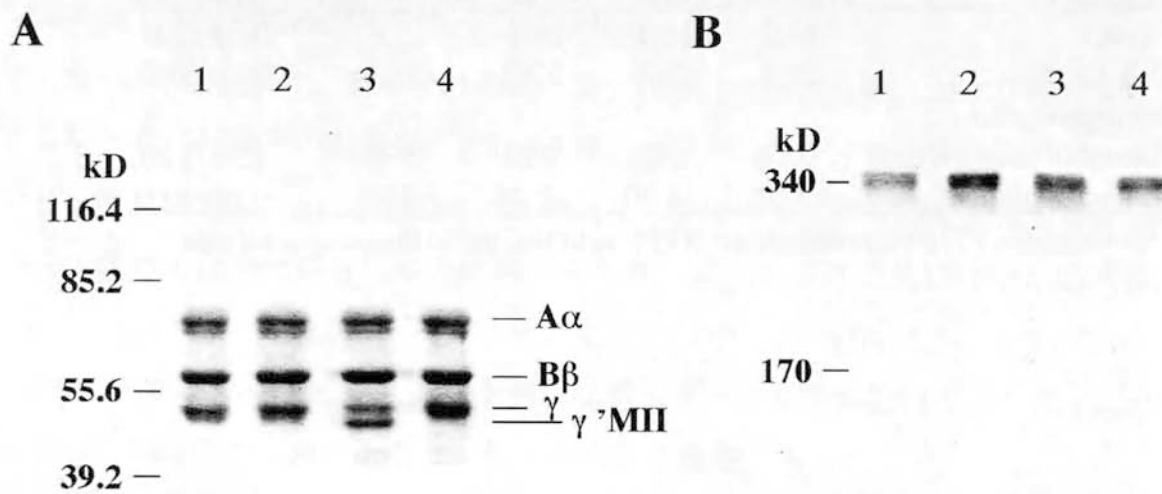


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of Fibrinogen Matsumoto I, II, III. Under reducing conditions (A) and nonreducing conditions (B). lane 1, normal control; 2, Fibrinogen Matsumoto I; 3, Fibrinogen Matsumoto II; 4, Fibrinogen Matsumoto III.

5. フィブリノペプチドAおよびフィブリノペプチドBの放出能

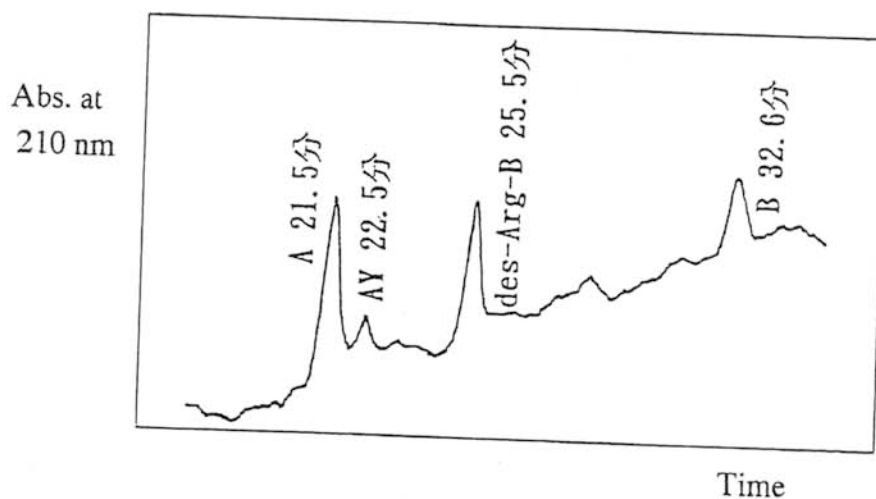
M・Iでは発端者の母親の血漿から、M・IIでは発端者の血漿から精製したフィブリノゲンについてトロンビンの作用によるフィブリノペプチドA (FPA), フィブリノペプチドB (FPB) の放出能を測定した (Fig.5). M・IのFPAの放出量は、1分で43.2%, 2.5分で61.0%, 5分で79.0%, 10分で84.3%, 20分で93.0%, 40分で99.4%, 80分で96.9%であった. FPBの放出量は、1分で13.3%, 2.5分で37.4%, 5分で48.6%, 10分で58.0%, 20分で72.8%, 40分で83.8%, 80分で97.5%であった (Fig. 6-M I).

M・IIではFPAの放出量は、1分で45.8%, 2.5分で68.5%, 5分で71.0%, 10分で76.3%, 20分で87.0%, 40分で93.8%, 80分で97.9%であった. FPBの放出量は、1分で8.7%, 2.5分で40.8%, 5分で58.3%, 10分で73.8%, 20分で80.8%, 40分で91.4%, 80分で98.5%であった (Fig. 6-M II). M・I, M・IIともに、正常なフィブリノゲンの場合と比較してFPA, FPBの放出速度および放出量に差は認められなかった. なお、正常フィブリノゲンにおいても、トロンビンによるFPAの放出がFPBの放出に先行することが知られている^{29, 30}).

6. DNA塩基配列解析および制限酵素処理

M・Iの発端者および両親、叔父について解析したところ、発端者および母親、叔父の γ 鎖エクソンIXにある第9380番ヌクレオチド (GenBank No., 以下同じ) に、グアニン (G) とシトシン (C) の2つの塩基のピークが認められた. サブクローニングした14クローンについて解析したところ、この位置の塩基のGとCの存在比は6 : 8であり、GとCのヘテロ接合体であることが明らかになった (Fig. 7). このG \rightarrow C置換により、 γ 鎖364番アミノ酸は、GATでコードされるwild typeのアスパラギン酸 (Asp) が、CATでコードされるヒスチジン (His) に置換する. 一方、父親の γ 鎖364番アミノ酸をコードする塩基はwild typeのGATであった.

M・IIの発端者および父親、次男について解析したところ、 γ 鎖エクソンVIIIにある第7576番ヌクレオチドに、チミン (T) とグアニン (G) の2つの塩基のピークが認められた. サブクローニングした10クローンについて解析したところ、この位置の塩基のTとGの存在比は4 : 6であり、TとGのヘテロ接合体であることが明らかに

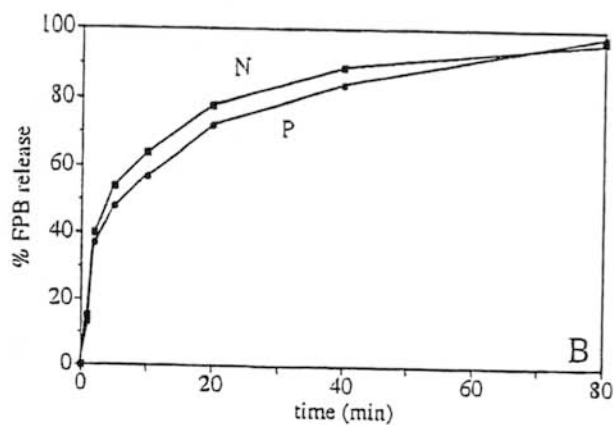
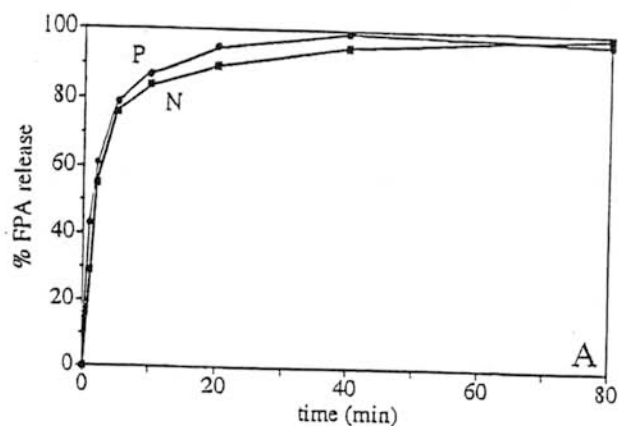
A**B**

A : ADSGEGDFLAEGGGVR
AY : DSGEGDFLAEGGGVR
B : ZGVNDNEEGFFSAR
des-Arg-B : ZGVNDNEEGFFSA

Fig. 5 Thrombin-catalyzed fibrinopeptide release from normal fibrinogen as determined by reverse-phase HPLC, under the following conditions: buffer system; solvent A (0.025 M ammonium acetate, pH 6.0), solvent B (50% acetonitrile for HPLC and 50% 0.05 M ammonium acetate, pH 6.0), gradient; 12-28% B in 30 min and followed by 28% B in 5 min, flow rate; 1.0 mL/min. The peptide detected at 210 nm.

The amino acid sequences of the A and AY peptides (FPA) and the des-Arg-B and B peptides (FPB) are shown in B.

MI



MII

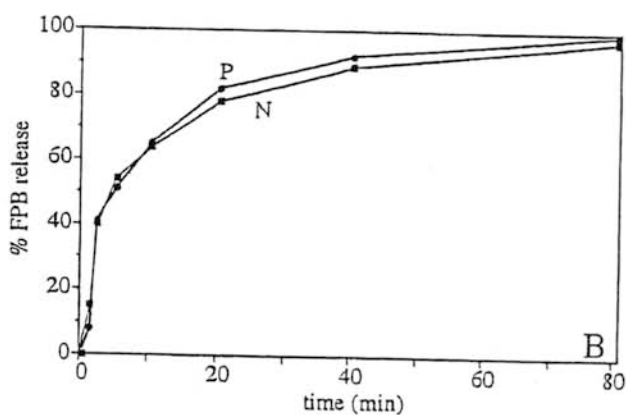
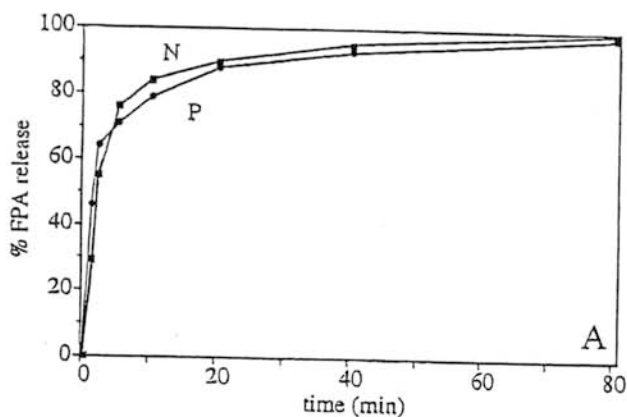


Fig. 6 Release of FPA and FPB induced by thrombin from purified normal fibrinogen, fibrinogen Matsumoto I (M I) and fibrinogen Matsumoto II (M II) as determined by HPLC. The percent release was calculated regarding the amount of normal FPA (the A and AY peptides) and FPB (the des-Arg-B and B. peptides) released at 16 h of incubation as 100 %. Representative release of FPA and FPB out of three normal fibrinogens was shown in this figure. N and \blacksquare : FPA or FPB of normal fibrinogen, and P and \bullet : FPA or FPB of fibrinogen Matsumoto I and II.

なった (Fig. 8). このT→G置換により, γ 鎖308番アミノ酸は, AATでコードされる wild typeのアスパラギン (Asn) が, AAGでコードされるリジン (Lys) に置換する.

M・IIIの発端者では, γ 鎖エクソンVIIIにある第7475番ヌクレオチドに, シトシン (C) とチミン (T) の2つの塩基のピークが認められた (Fig. 9). エクソンVIIIを含む685塩基のPCR産物を Sca Iで処理したところ, 正常なものでは486と199塩基の2本のバンドがみられたが, 発端者の場合には, 486, 440, 199, 46 の4本のバンドが認められた (Fig. 10). Sca IはAGTACTを認識する制限酵素であるため, 正常なヒトの配列AGTACCの3'末端CがTに変化したと考えられる. これらの結果から, 発端者においては第7475番塩基はCとTのヘテロ接合体であることが明らかになった. そしてC→T置換により, γ 鎖275番アミノ酸は, CGCでコードされる wild type のアルギニン (Arg) が, TGCでコードされるシステイン (Cys) に置換する.

7. TCFP 試験の比較

1 アミノ酸置換の構造異常をもつM・I, II, IIIについて, トロンビンの添加によりフィブリノゲンからフィブリンになる過程のモニターとなるthrombin-catalyzed fibrin polymerization (TCFP) 試験を行ない, 正常なフィブリノゲンと比較して, 構造異常と機能異常の関連について検討した. まず, 血漿中の生理的な濃度である1.0 mMのカルシウムイオンを反応溶液中に添加した場合, lag timeの平均は, M・Iでは2.8分, M・IIでは2.4分, M・IIIでは4.3分であったが, 正常フィブリノゲンでは1.1分であった. また最大重合速度は, M・Iでは10.1, M・IIでは78.4, M・IIIでは39.2であったが, 正常では102.6であった. 反応溶液中のカルシウムイオンを, 1.0 mMから0.1, 0.01 mMと低下させていくにしたがってlag timeは延長し, 最大重合速度は低下していく様子が観察された. 反応溶液中に1 mM EDTAを添加してカルシウムイオンをゼロとした場合のlag timeはM・Iでは14.0分, M・IIでは17.0分, M・IIIでは重合反応はほとんどみられず計測不可であったが, 正常フィブリノゲンでは2.5分であった. また最大重合速度は, M・Iでは2.1, M・IIでは14.0, M・IIIでは計測不可であったが, 正常では65.0であった (Fig. 11) (Table 5).

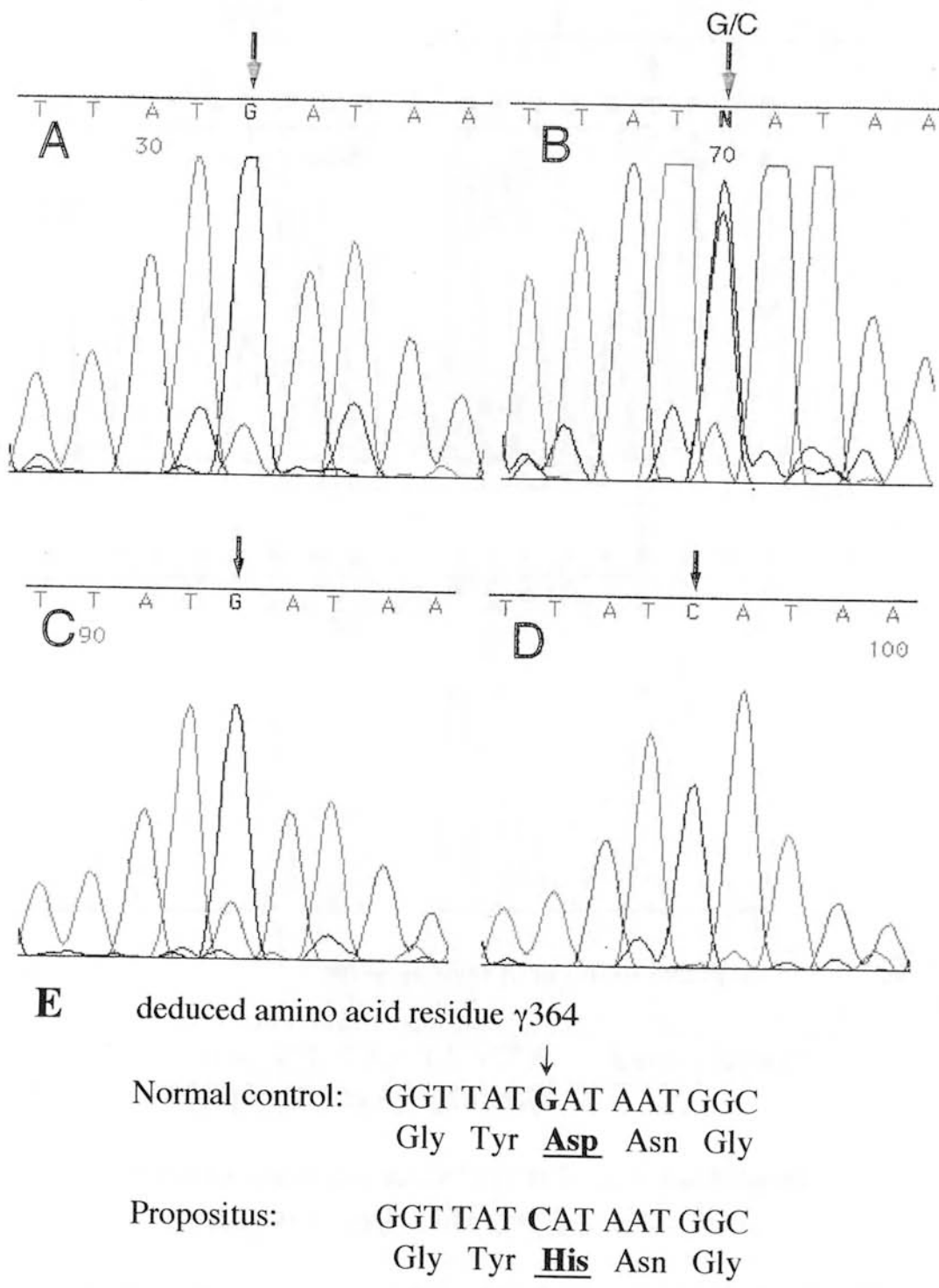
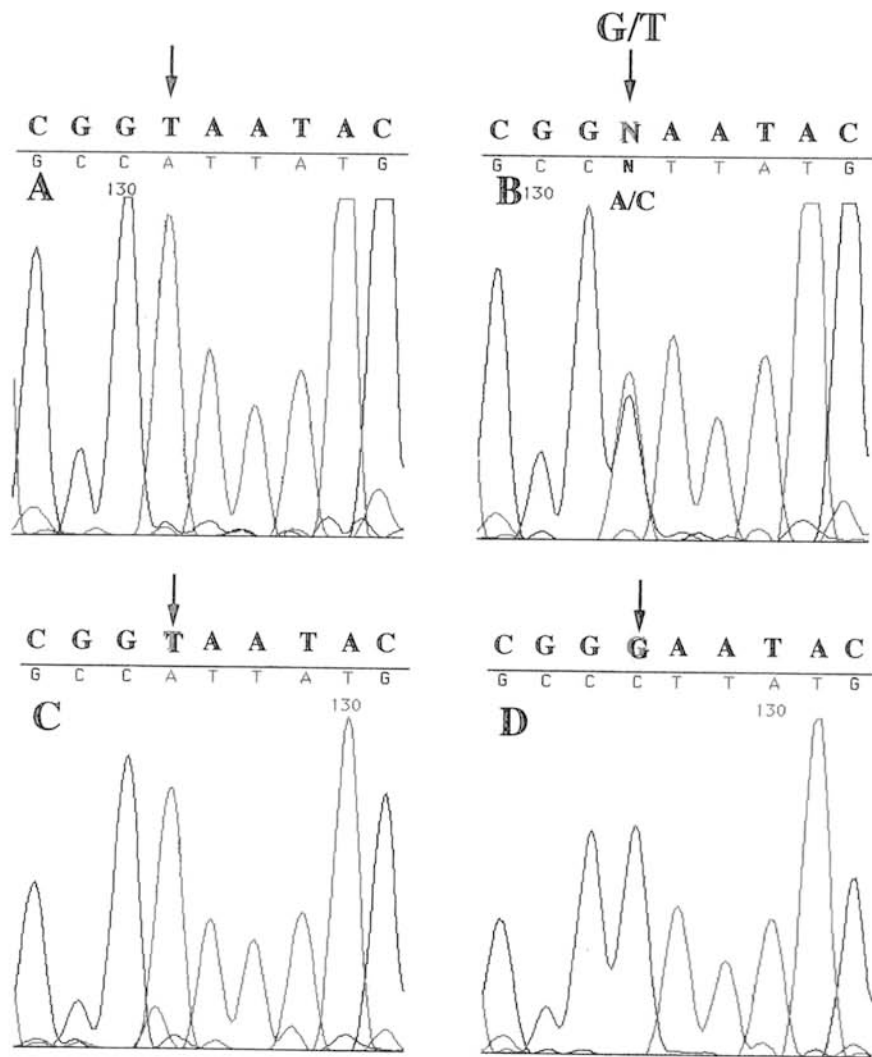


Fig. 7 Nucleotide sequence of the fibrinogen γ -chain gene exon IX. The PCR amplified γ -chain genes of the normal control (A) and of the propositus (B) were directly sequenced by dideoxy termination method. The nucleotide at position 9380, indicated by the arrow in B, of the propositus' gene was heterozygous for G and C, whereas that of the normal gene was homozygous for G. Subsequently, the PCR product was subcloned and 14 clones were similarly sequenced. As shown in C and D, the nucleotide at position 9380 (indicated by the arrow) was G in 8 clones and C in 6, confirming the results of direct sequencing. This nucleotide substitution changed the γ 364 Asp \rightarrow His as shown in (E).



E deduced amino acid residue γ 308

↓

Normal control: TCC CAT AAT GGC ATG
 Ser His Asn Gly Met

Propositus: TCC CAT AAG GGC ATG
 Ser His Lys Gly Met

Fig. 8 Nucleotide sequence of the fibrinogen γ -chain gene exon VIII. The PCR amplified γ -chain genes of the normal control (A) and of the propositus (B) were directly sequenced by dideoxy termination method using the reverse primer. The nucleotide at position 7576, indicated by the arrow in B, of the propositus' gene was heterozygous for T and G, whereas that of the normal gene was homozygous for T. Subsequently, the PCR product was subcloned and 10 clones were similarly sequenced. As shown in C and D, the nucleotide at position 7576 (indicated by the arrow) was T in 4 clones and G in 6, confirming the results of direct sequencing. This nucleotide substitution changed the γ 308 Asn \rightarrow Lys as shown in (E).

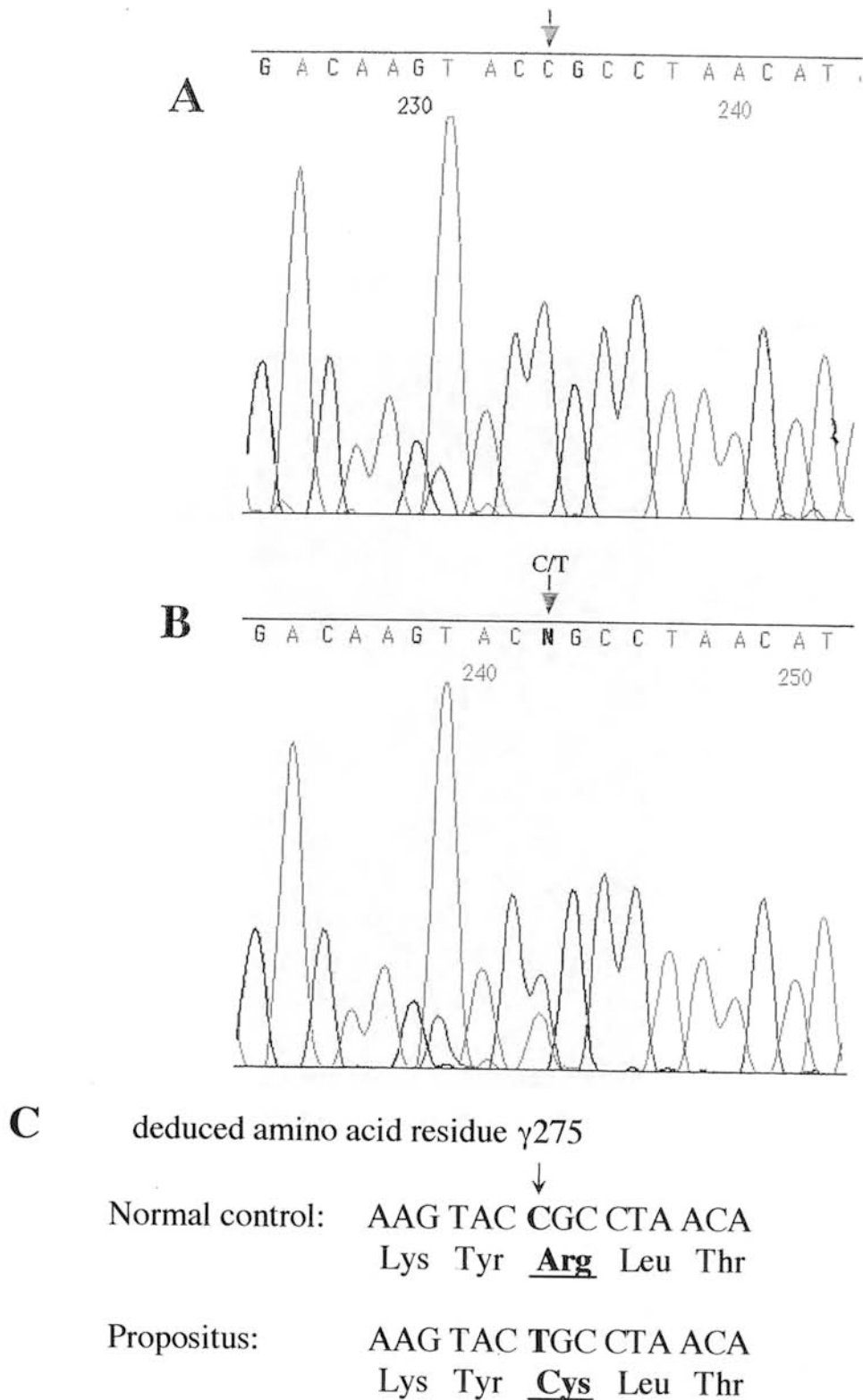


Fig. 9 Nucleotide sequence of the fibrinogen γ -chain gene exon VIII. The PCR amplified γ -chain genes of the normal control (A) and of the propositus (B) were directly sequenced by dideoxy termination method. The nucleotide at position 7475, indicated by the arrow in B, of the propositus' gene was heterozygous for C and T, whereas that of the normal gene was homozygous for C. This nucleotide substitution changed the γ 275 Arg to Cys as shown in (C).

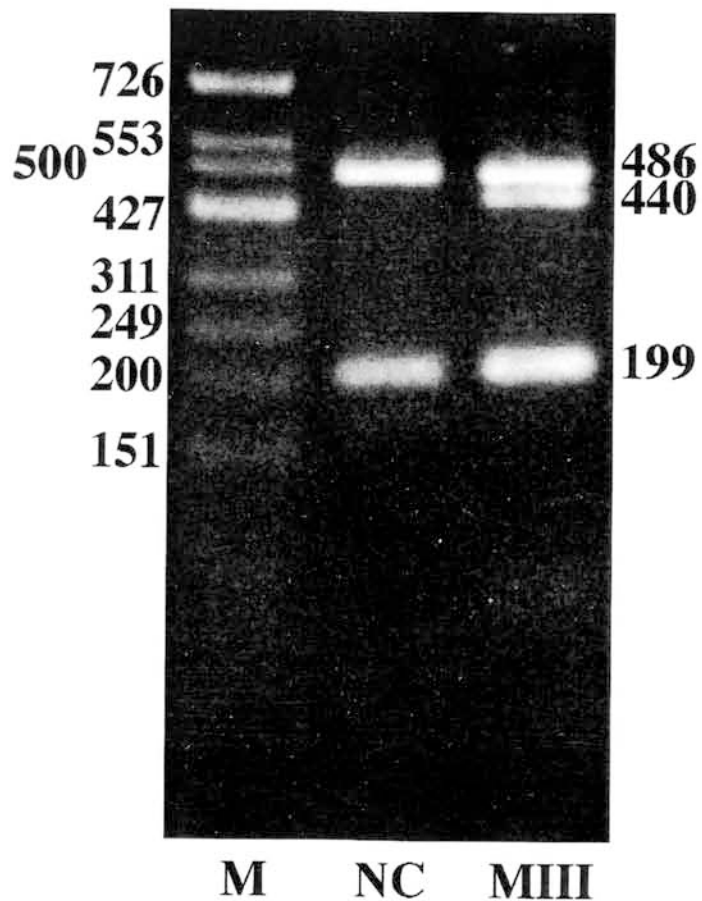


Fig. 10 Endonuclease restriction digestion of fibrinogen γ -chain gene exon VIII. The PCR amplified γ -chain genes of the normal control (NC) and of the propositu (M III) were digested by *Sca* I. The normal control showed 2 bands of 486 and 199 bp, and heterozygous propositus showed 4 bands of 486, 440, 199 and 46 bp.

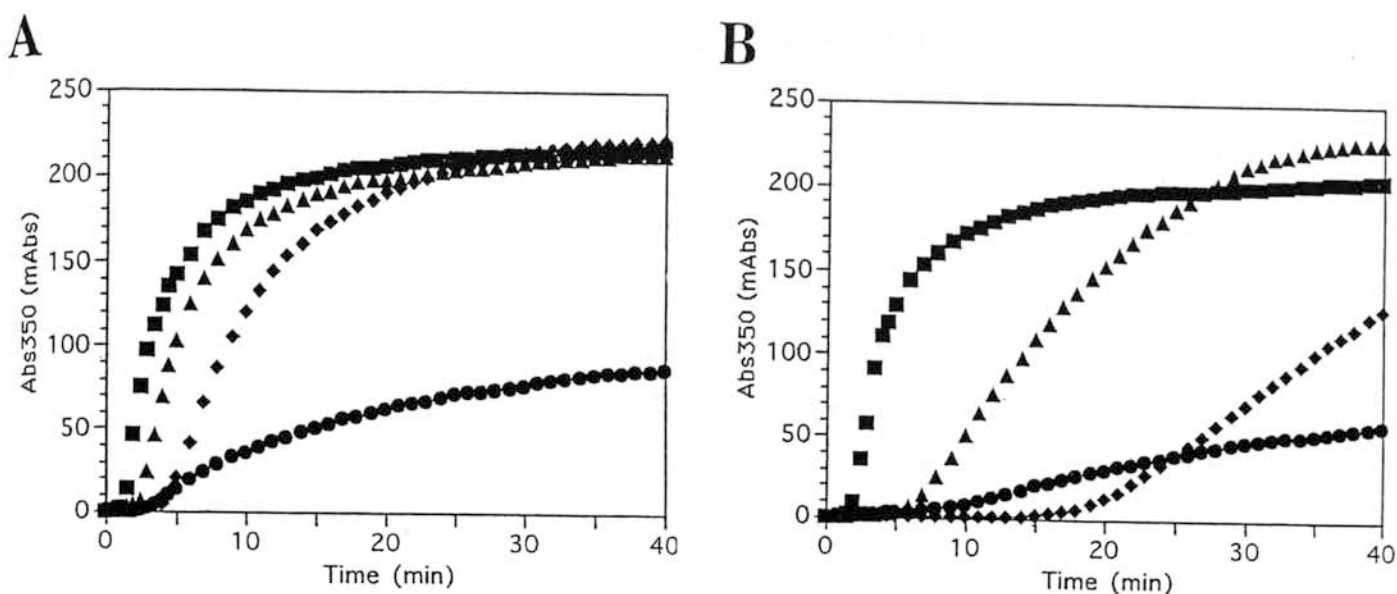


Fig. 11 Thrombin-catalyzed fibrin polymerization. The change in turbidity with time was followed at 350 nm with normal plasma fibrinogen(■) and three variant fibrinogens, Matsumoto I (●), Matsumoto II (▲) and Matsumoto III (◆). Thrombin (0.05 units/mL) was added at 0 min to fibrinogen at 0.18 mg/mL in the presence of 1 mM CaCl₂ (panel A) or in the absence of Ca ions (panel B).

Table 5 Analysis of fibrin polymerization curve initiated by thrombin

Ca or EDTA concentration (mM)	Normal control		Matsumoto I		Matsumoto II		Matsumoto III	
	Lag period	Vmax	Lag period	Vmax	Lag period	Vmax	Lag period	Vmax
Ca 1.0	1.1±0.1	102.6±10.3	2.8±0.3	10.1±0.5	2.4±0.2	78.4±7.8	4.3±0.3	39.2±2.1
Ca 0.1	1.3±0.1	106.6±11.3	3.7±0.4	7.9±0.4	2.8±0.3	59.3±6.3	5.2±0.3	23.8±1.9
Ca 0.01	1.4±0.1	86.0±9.7	4.8±0.4	5.9±0.4	3.5±0.3	56.7±6.0	12.4±1.1	12.4±1.3
Ca 0.00	1.7±0.1	88.9±9.9	6.0±0.5	3.8±0.2	6.2±0.5	21.9±3.1	18.9±1.7	10.4±1.2
EDTA 1.0	2.5±0.2	65.0±7.0	14.0±1.1	2.1±0.2	17.0±0.9	14.0±1.8	ND	ND

Lag period is shown in min. Vmax, the maximum slope of the turbidity curve, is shown in the form $\times 10^{-3}/\text{sec}$. Fibrinogen concentration was 0.18 mg/mL and thrombin concentration was 0.05 units/mL. All results are the averages and standard deviations from three experiments. ND shows not detectable even after 1 hour's incubation.

8. 考 察

フィブリノゲン異常症をもたらす1アミノ酸置換症例の大部分は、フィブリノゲンの3本のポリペプチド鎖のうち、A α 鎖アミノ基末端(N末端)側と γ 鎖カルボキシル基末端(C末端)側に見い出されている。A α 鎖の異常ではFPAの放出障害を示すものと、放出後のペプチドのN末端の変異によりフィブリン重合障害を示すものが多い^{9, 12)}。このうち、 γ 鎖の構造異常が明かにされている報告例によると、 γ 鎖268-380残基に集中している。すなわちこの領域がフィブリン重合反応において重要な機能を持っているために、著しい重合障害として見つかり易いということを示している。

フィブリノゲンは3本のポリペプチドのN末端側でS-S結合により二量体を形成しており、2つのC末端側は互いに反対側に離れて存在している。中央のN末端側をE domain、両側のC末端側をD domainと呼んでいる。フィブリノゲンがフィブリンとなり重合していく際には、まずトロンビンの作用によりFPAが放出され、つづいてFPBが放出される(desABフィブリン=フィブリンモノマー)と、E domainに反応基('A'と'B')が露呈される³¹⁾。この'A'と'B'がそれぞれ別のフィブリンモノマー分子のD domainの中にある相補的結合部位'a'と'b'に結合し、短軸方向にD-E結合が生じる。同時に長軸方向に別々のフィブリンモノマー分子のD domain同志が結合(D-D)し、フィブリンモノマーは2本鎖らせん状のprotofibrilとなる。やがてこのようなprotofibrilが一定の長さに達すると、互いにまとまり束を形成し(これをlateral aggregationという)、さらに分岐してフィブリン繊維を形成しゲル化する³²⁻³⁴⁾(Fig. 3)。

最近のX線結晶解析により、 γ 鎖337-379番アミノ酸がFPA放出後に露呈される α 鎖のN末端のGly-Pro-Arg-Pro('A')の結合部位('a')であり、しかも γ 364 Aspがその中心的役割を果たしていることが証明された³⁵⁾。したがって、M・Iは γ 鎖364残基が酸性アミノ酸のAspから塩基性アミノ酸のHisに変異したことにより、フィブリンの重合過程の初期段階であるD-E結合を障害するものと思われた。M・Iと同じD-E結合領域である γ 鎖337-379残基に1アミノ酸置換を認めた報告には、Bern I(γ 337Asn \rightarrow Lys)³⁶⁾、Milano VII(γ 358Ser \rightarrow Cys)³⁷⁾、Osaka V(γ 375Arg \rightarrow Gly)³⁸⁾、Melun I(γ 364Asp \rightarrow Val)³⁹⁾などがある。

M・IIIは γ 鎖275番アミノ酸のArgがCysに置換していたが、この残基の置換に関する報告は γ 鎖中で最も多くみられ、すでに19例の報告がある。そのうちCysに変異したもの9例⁴⁰⁻⁴⁹⁾、Hisに変異したもの9例⁴⁹⁻⁵⁵⁾、Serに変異したもの1例⁵⁶⁾であった。このように γ 鎖7475番ヌクレオチドは変異しやすい部位である可能性とともに、 γ 鎖275番アミノ酸はフィブリンの重合反応にとって非常に重要な役割を果たしていることが推測される。M・IIIと同じ変異をもつOsaka II⁴⁷⁾では、置換したCysが血漿中の遊離CysとS-S結合していることが報告されているが、M・IIIを含めて残りの報告例では、これに関する検討は行なわれていない。しかしM・IIIでは、SDS-PAGEのパターンには正常な場合との差異は認められていないことから、血漿中アルブミンのような高分子のものとの結合はないものと考えられた。

MosessonらのFibrinogen Tokyo II (γ 275Arg \rightarrow Cys)の詳細な研究⁵⁷⁾および最近のX線結晶解析の結果⁵⁸⁾から、 γ 鎖の三次元構造上、最も外側の領域である275から300番アミノ酸が、D-D結合において重要であることが明かにされた。この領域では、二つのフィブリン分子をそれぞれF1、F2とすると、F1分子内の γ 鎖275番Argのguanidino基が、F2分子の γ 鎖300番Serのhydroxy基と水素結合することと、F2分子の γ 鎖275番Argのguanidino基は、F1分子の γ 鎖280番チロシン(Tyr)と水素結合していることが証明された(Fig. 12)。D-D結合部である γ 鎖275-300残基近傍アミノ酸変異例では γ 鎖275の他に、ホモ接合体であるKurashiki I (γ 268Gly \rightarrow Glu)⁵⁹⁾、ヘテロ接合体であるBaltimore I (γ 292 Gly \rightarrow Val)⁶⁰⁾があるが、これらのフィブリン重合障害の程度は比較的軽度である。 γ 鎖275番の変異はもっとも高頻度でみられ、いずれも著しい重合障害を呈しており、私の報告と一致している。Borrellらの報告⁴⁹⁾によるVillajoyosa (γ 275Arg \rightarrow Cys)とBarcelona III (γ 275Arg \rightarrow His)、Barcelona I (γ 275Arg \rightarrow Cys)の2種の比較、さらにはNiwaらの報告⁶¹⁾によるKamogawa (γ 275Arg \rightarrow Ser)、Tokyo II (γ 275Arg \rightarrow Cys)、Saga (γ 275Arg \rightarrow His)の3種の比較検討によると、フィブリンの重合障害の程度は γ 275Ser、 γ 275His、 γ 275Cysの順に著しくなることが観察されている。

一方、M・IIと同様の γ 308Asn \rightarrow Lys置換によるフィブリンノゲン異常症は、すでにKyoto I⁶²⁾、Bicetre II⁶³⁾の2例が報告されていた。またBaltimore III⁶⁴⁾は γ 308Asnがイソロイシン(Ile)に置換した症例であった。AsnからLysへの置換例では、いずれ

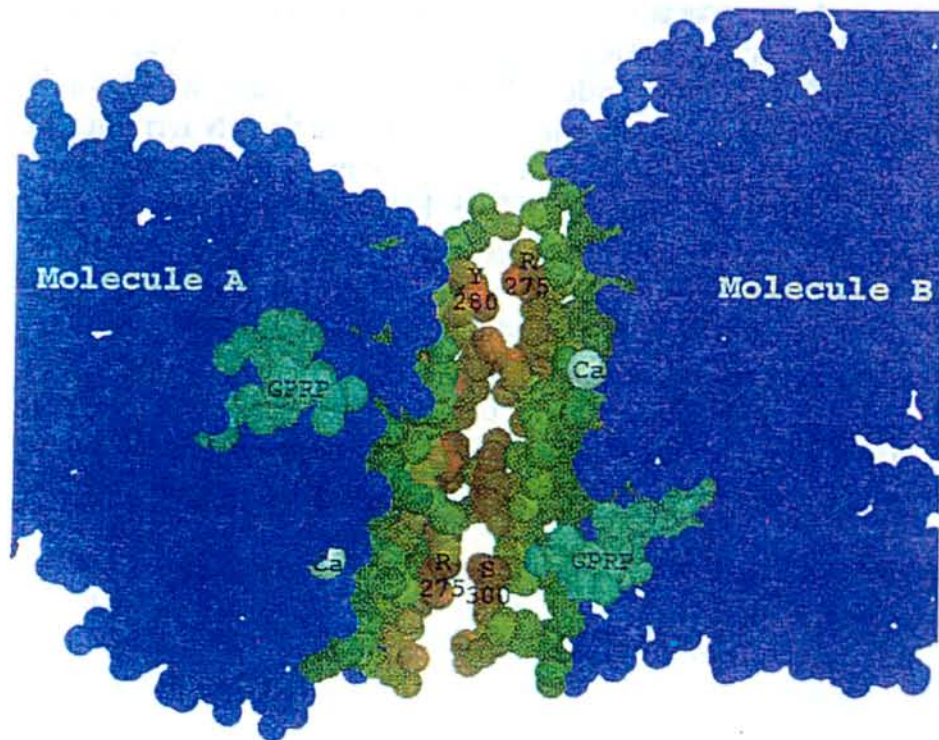


Fig. 12 A view across the D-D interface. Close-up showing structural details of end-to-end abutment of fragments D in double-D: R, Arg γ 275; Y, Try γ 280; S, Ser γ 300; Ca, calcium atoms; GPRP, Gly-Pro-Arg-Pro-amide ligands. The residues at the interface are coloured according to their nearest distances to residues on the other side of the crevice, red being shortest and greater distances shading toward green. (from Ref. 58)

もトロンビン時間法によるフィブリノゲン量は、免疫法により測定した場合の約30%程度で一致していたが、AsnからIleへの変異例では約60%であった⁶⁴⁾。さらに興味あることには、M・IIにみられるように、1アミノ酸の置換を生じた γ 鎖は、SDS-PAGEにおける易動度が変化し、みかけ上、1,500-2,000程度も低分子に観察されることである。これについては、中性親水性アミノ酸であるAsnが塩基性であるLys、あるいは疎水性であるIleに置換しているために、SDSとアミノ酸側鎖との結合力が変化して、易動度が速くなるとの報告がある。この現象はフィブリノゲン Nagoya (Glu→Arg)⁶⁵⁾、フィブリノゲン以外では、 α -crystallin A⁶⁶⁾、*Salmonella typhimurium* の histidine-binding protein J⁶⁷⁾ においても認められている。 γ 308番アミノ酸の変異によるフィブリノゲン異常症例の臨床症状を比較すると、Kyoto Iには出血、血栓傾向は特になかったものの、Bicetre IIでは血栓症が認められた。これに対してM・IIとBaltimore IIIでは出産後の出血量が多いなどの明らかな出血傾向が認められている。

γ 鎖311-336残基⁶⁸⁾ (とりわけ γ 318-324残基⁶⁹⁾) はカルシウム高親和性結合部位とされている。カルシウムはフィブリンの立体構造を維持することにより、フィブリン重合反応を促進する機能をもっていると考えられる。このため生理的濃度のカルシウムイオン存在下 (1.0 mM) では、 γ 鎖308残基近傍の変異例でVellisingen⁷⁰⁾ (γ 319, 320 deletion) を除き重合反応の異常が軽度であるものと思われる。 γ 鎖308残基近傍のアミノ酸置換例の報告中、310残基がメチオニン (Met) からスレオニン (Thr) に置換したことにより、 γ 308Asnに糖鎖が結合したAsahi⁷¹⁾ に弱い出血傾向が認められている。

フィブリノゲンのどの領域が、フィブリン重合反応第二段階であるprotofibrilの lateral aggregationに重要であるのかは、いまだよく解明されていない^{72,73)}。しかしFPBの放出⁷⁴⁾、 α 鎖のC末端領域³²⁻³⁴⁾、カルシウムイオンのフィブリンへの結合^{75,76)}などが、lateral aggregationを増強することが知られている。また、WeiselとNagaswami³⁰⁾はフィブリン重合反応のシュミレーションに基づき、protofibrilの形成速度あるいはlateral aggregationの速度の変化はlag timeと重合速度の両方を変化させるとしている。すなわちprotofibrilの形成速度が遅いとlag timeが延長し、重合速度も低下する。また、lateral aggregationの速度が遅いと、やはりlag timeが延長し、

重合速度も低下する。今回の実験でフィブリン重合反応を評価したlag timeは protofibrilの形成速度を反映し、重合反応曲線の最大吸光度変化率はlateral aggregationの速度を反映している³⁰⁾。今回報告したM・I、M・IIIを比較すると、いずれのカルシウム濃度においても、M・IIIではM・Iよりもlag timeが長いにもかかわらず、最大重合速度が大きかった。これらの結果はM・IIIの γ 275番Argが関与するD-D結合部位の異常は、D-D結合が遅れることによりlag timeが延長するが、protofibrilが一定の長さに達すると、lateral aggregationは順調に進むと考えられる。一方、M・I(γ 364Asp)を含む‘a’の三次元構造の異常は、D-E結合が遅れることによりlag timeが延長するだけでなく、lateral aggregationが順調に進まないと考えられる。このことは、D-D結合部位はlateral aggregationにさほど重要な部位ではないが、D-E結合部位とりわけ‘a’ siteはlateral aggregationに必須の重要な構造を有していることが強く示唆された。これはOkumuraらが報告した結果⁷⁷⁾ともよく一致するものであった。

第3章

フィブリノゲン欠損症における 原因の解明

第 3 章

フィブリノゲン欠損症における原因の解明

第1節 Fibrinogen Matsumoto IVの発見

1. 緒言

無フィブリノゲン血症や低フィブリノゲン血症は、血漿中フィブリノゲン濃度が、タンパク量としてもほとんどないか、あるいはきわめて低値を示すものである。無フィブリノゲン血症に関する報告は、現在までに150を越える報告¹⁴⁾が、また低フィブリノゲン血症については約40例の報告がある¹⁶⁾。しかし、先天性の無フィブリノゲン血症や低フィブリノゲン血症に関する遺伝子解析の報告は、1999年になって唯一1例報告されたにすぎない¹⁷⁾。凝固・線維素溶解(線溶)関連タンパクとしては、フィブリノゲンのほかにプロテインC¹⁸⁾、プロテインS¹⁹⁾、アンチトロンビンIII²⁰⁾、第VII因子²¹⁾など多くのものがあるが、これらの欠乏症に関してはすでにDNAあるいはRNAからの遺伝子解析がなされており、いくつかの報告もみられている。

私は1996年に、フィブリノゲンのタンパク量・活性量がともに低下していることから、いわゆる欠損症が疑われる1例を見い出した。この症例について遺伝子解析を行ったところ、 γ 鎖153番アミノ酸がCysからArgへ置換していることが判明した。この置換によりフィブリノゲン分子中の同一 γ 鎖上にある153Cysと182Cysとの間のS-S結合が欠如することになり、著しい三次構造の異常をもたらすことが推察された。この1アミノ酸置換がフィブリノゲン欠損症を引き起こす機序について検討した。

2. 症例

発端者は21才、女性である。出血あるいは血栓傾向などの症状は認められなかったが、健康診断を受けた際にフィブリノゲンの異常低値を指摘され、精密検査のため信州大学医学部附属病院を受診した。

3. 凝固スクリーニング検査結果

患者血漿中のフィブリノゲン濃度は、活性量が0.81 g/L、抗原量が0.87 g/Lであり、ともに正常域である1.50–3.00 g/Lの2分の1以下であった。PTは14.1秒(正常値 10.0–12.0 秒)であり軽度の延長がみられたが、APTTは 36.0秒(正常値 24.0–37.0 秒)と正常範囲内であった。

4. SDS-PAGEとWestern blottingによる観察結果

イムノブロッティングによる患者のフィブリノゲンのA α , B β , γ 鎖の分子量と相対量は、正常対照のものと比較して差異は認められなかった。

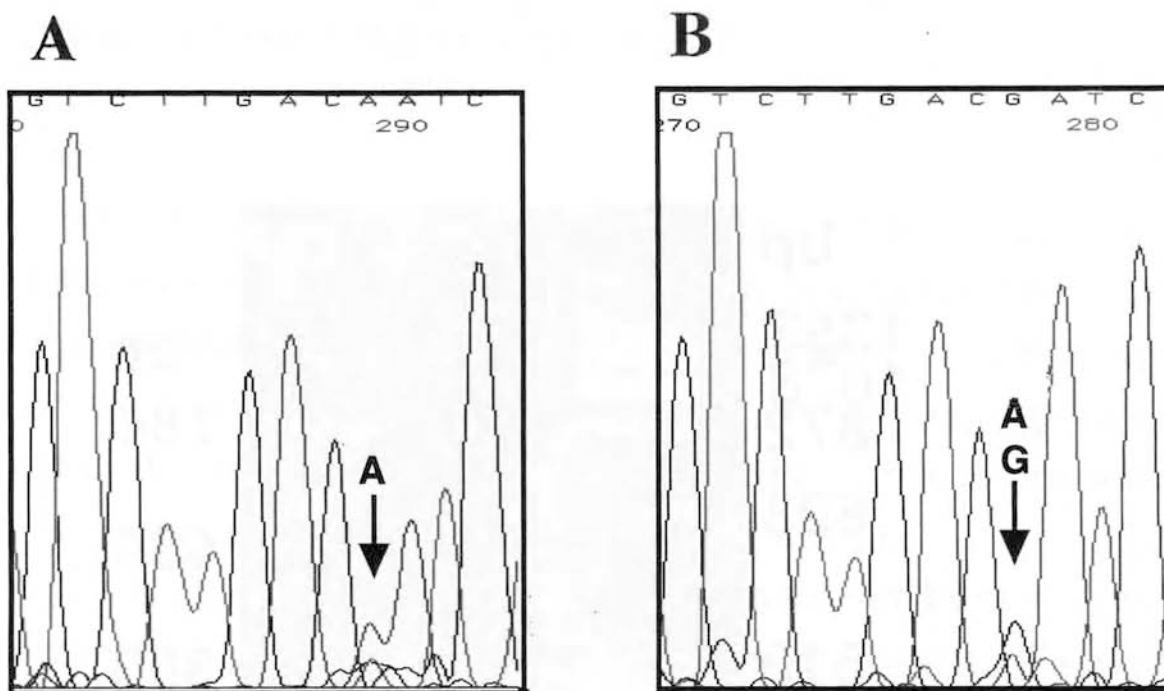
5. 遺伝子解析

1) DNA塩基配列

フィブリノゲンを構成する3本のポリペプチドの全エクソンおよびエクソン-イントロン結合部のPCR産物をダイレクトシーケンスした。発端者では γ 鎖4647番ヌクレオチドに、TとCの2つの塩基のピークが認められたが、正常対照においてはTのみであった(Fig. 13)。この結果、発端者はTとCとのヘテロ接合体である可能性が考えられた。このTからCへのヌクレオチドの置換は、 γ 鎖153番アミノ酸がTGTでコードされるCysから、CGTでコードされるArgに置換することを示している。また発端者は、A α 鎖312番アミノ酸がAla (GCT)とスレオニン(Thr, ACT)のヘテロ接合体であることを示したが、この部位はすでにpolymorphism(遺伝子多型)としての報告がされており、この遺伝子多型とフィブリノゲンの血漿中レベル、あるいは疾患に対する傾向などとの間に関連があるとの見解はない⁷⁸⁾。

2) 制限酵素によるPCR産物の切断

発端者のゲノムDNA塩基配列の解析結果から、 γ 鎖4647番目がTとCのヘテロ接合体である可能性は大きいものの、センス鎖とアンチセンス鎖の解析結果はともに非常に小さなシグナルであった。そこで発端者と正常対照の γ 鎖エクソンVIのPCR産物を制限酵素Mbo Iで処理したところ、発端者では784, 484, 300塩基対の3本、正常対照では784塩基対の1本のバンドが検出された(Fig. 14)。Mbo IIはGATCを認



C deduced amino acid residue γ 153

↓

Normal control: GAT TGT CAA GAC
 (Asp) Cys Gln Asp

Propositus: GAT CGT CAA GAC
 (Asp) Arg Gln Asp

Fig. 13 Nucleotide sequence of the fibrinogen γ -chain gene exon VI. The PCR-amplified γ -chain genes of the normal control (A) and the propositus (B) were directly sequenced by dideoxy termination method using the reverse primer. The nucleotide at position 4647, indicated by the arrow in B, of the propositus' gene was heterozygous for A and G, whereas that of the normal gene was homozygous for A. This nucleotide substitution changed the γ 153 Cys \rightarrow Arg as shown in (C). The underlined nucleotide is located in the intron region.

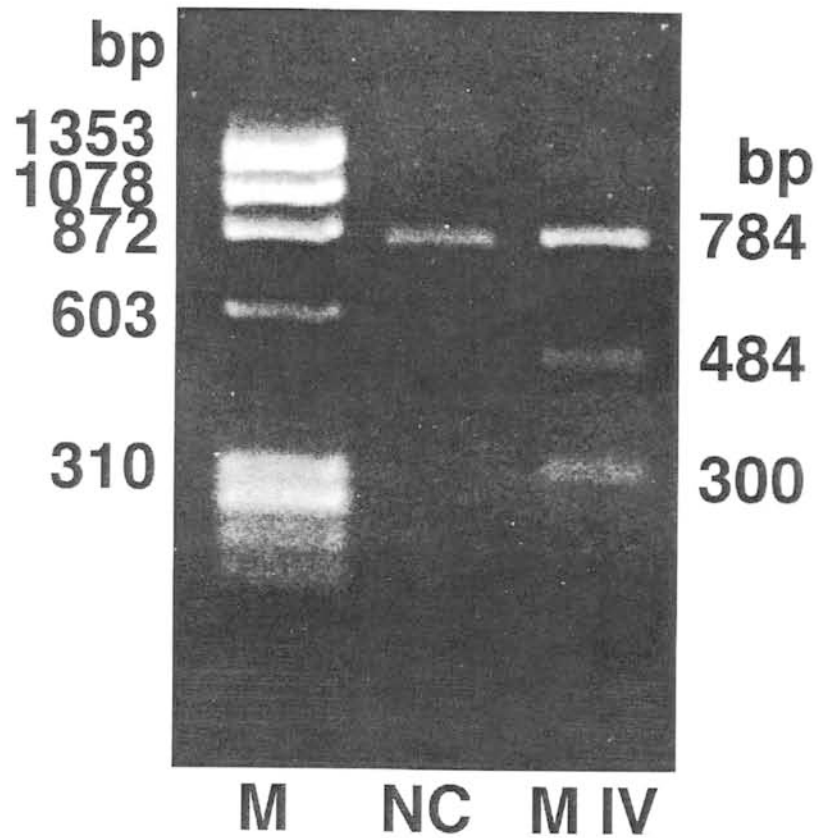


Fig. 14 Endonuclease restriction digestion of fibrinogen γ -chain gene exon VI. The PCR-amplified γ -chain genes of the normal control (NC) and of the propositus (M IV) were digested by *Mbo* I. The normal control showed one band of 784 bp, and heterozygous propositus showed 3 bands of 784, 484 and 300 bp.

識する制限酵素であるため，正常なヒトの配列GATTの3'末端TがCに変化したと考えられる．このことから，発端者の γ 鎖エクソンVIの4647番ヌクレオチドはwild typeのTとmutant typeのCのヘテロ接合体であり，TからCへの置換により， γ 鎖153番アミノ酸はCysからArgに置換していることを確認した．

6. 考 察

血漿中のフィブリノゲン濃度が，活性量 (0.81 g/L) とタンパク量 (0.87 g/L) ともに低値を示した1症例について遺伝子解析を行ったところ， γ 鎖DNA4647番ヌクレオチドがTからCへ置換しているヘテロ接合体であることが判明した．この結果，発端者フィブリノゲンでは肝細胞内において生成されるフィブリノゲンは， γ 鎖153番アミノ酸がCysからArgに置換したものが生成される可能性を示しており，この異常フィブリノゲンをFibrinogen Matsumoto IV (以下 M・IV) と命名した．

M・IVは，同一 γ 鎖上の153Cys-182Cysとの間のS-S結合を欠く異常タンパクである可能性が疑われたものの，残念ながら発端者の血縁者の検査は同意が得られなかった．したがって， γ 153Cys→Argの変異が欠損症の原因であることを間接的に証明することはできなかった．このため， γ 153Cys→Argへの変異がどのような機序でフィブリノゲン欠損を招くのか，あるいは，血中に放出されるもののすみやかに分解されてしまうのかなどを明かにするために，同じ異常 γ 鎖を有するフィブリノゲンを作製し，その動態を観察して直接的に証明することにした．

第2節 異常フィブリノゲンの作製と欠損原因の解明

第1項 異常フィブリノゲンの発現

1. 緒言

欠損症を生じる遺伝子異常としては、プロモーター部分の異常、あるいはsplicing errorによるmRNAのレベルでの異常なども考えられる。しかし、フィブリノゲンは、肝細胞においてのみ生成され血中に放出されるタンパクであるため、患者mRNAの解析を行なうことは不可能であった。一方、 γ 153Cys-182CysのS-S結合は、 γ 鎖カルボキシル基末端(C末端)側の立体構造を維持するうえで非常に重要であり、このCysが他のアミノ酸に置換することにより三次元構造に著しい変化が生じることが推測された。このような構造異常により、合成されたタンパクが分泌されないことが推察される。

2. 材料および方法

[1] コンピテント細胞および発現ベクターの準備

1) competent cellの準備

E.coli BMH 71-18 *mut* Sと*E.coli* DH5 α は、それぞれ抗生剤である50 μ g/mLテトラサイクリンあるいは100 μ g/mLアンピシリンを添加した1.5% LB寒天培地に接種し、37°Cで1晩培養した。独立したコロニーを拾って、培養液(LBブロス, DIFCO) 5 mLで1晩振とう培養した後、このうちの1 mLを抗生剤を含まないLBブロス 100 mLに加え、培養液の吸光度が600 nmにおいて 0.5 ± 0.03 となるまで(約2時間20分)振とう培養した。この対数増殖期の細胞を氷冷し、4,000 rpm 5分遠心した後、TSS (Transformation and Storage Solution for Chemical Transformation; 85% LB medium, 10% Polyethylene glycol, 5% Dimethyl- sulphoxide, 50mM MgCl₂, pH 6.5) 溶液に浮遊させた。今回のトランスフォーメーションでは、DNAのミスマッチを修復する能力を欠損した*E.coli* BMH 71-18 *mut* Sを1段階目のトランスフォーメーションのcompetent cellとして用い、2段階目のトランスフォーメーションには一般的に広く用いられる*E.coli* DH5 α をcompetent cellとして用いた。

2) 変異プラスミドの作製

(1) プラスミド

a) *Target plasmid*; フィブリノゲン γ 鎖の発現ベクターには Dr. S. T. Lord (The Univ. of North Carolina, USA) より提供して頂いた pMLP- γ を用いた. このベクターは, Dr. M. M. Rooneyら (The Univ. of North Carolina, USA) が構築したプラスミドで, フィブリノゲン γ 鎖のcDNAを組み込んであり, 哺乳動物細胞に導入されるとフィブリノゲン γ 鎖を発現する. pMLP- γ (p674) は, アデノウイルス2由来のmajor late promoter (MLP), tripartite leader sequenceと5'-splice site, マウスIgG遺伝子由来の3'-splice site, SV40由来のpolyadenylation site, およびアンピシリン (Ampicillin, Amp) 耐性遺伝子を持つ⁸⁶⁾. また, unique restriction siteとして *Hind* III siteがある. このpMLP- γ のcDNAをTransformerTM Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH) を用いてヌクレオチド置換⁸⁷⁾させ, 目的の変異をもつプラスミドを作製した.

b) *Control plasmid(pUC19M)*; Transformationの効率を求めるためのcontrol plasmidとしてpUC19Mを用いた. pUC19MはpUC19のlacZ geneの中のtryptophan codon (UGG) をstop codon (UAG) に置換させてあり, さらに, unique restriction siteとして *Nde* I restriction siteを有している.

(2) Selection primers

a) *Hind* III M; 5'-TCTAGGCCCCAGGCTTGTTTGC-3'

Target plasmid (pMLP- γ) の *Hind* III siteに変異をおこさせるために使用し, この変異が導入されると, pMLP- γ は *Hind* III で切断されない.

b) *Control primer 1*; 5'-p-GAGTGCACCATGGGCGGTGTGAAAT-3'

Control plasmid (pUC19M) の *Nde* I restriction siteを *Nco* I restriction siteにするために使用し, この変異が導入されるとcontrol plasmidは *Nde* I で切断されない.

(3) Mutagenic primers

a) γ 153 Cys \rightarrow Arg; 5'-TGGGAAAGATCGTCAAGACAT-3'

b) γ 153 Cys \rightarrow Ala; 5'-TGGGAAAGATGCTCAAGACATT-3'

それぞれTarget plasmidの γ 153CysをコードするTGTを, ArgをコードするCGTとAlaをコードするGCTに変異させるためのprimerである.

c) *Control primer 2* ; 5'p-CAGGGTTTTCCAGTCACGACG-3'

Control plasmid (pUG19M) のlacZ geneにあるstop codonをもとのトリプトファンのcodonにもどすためのprimerである。正常のlacZ geneになったpUC19Mは、5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl β -D-galactoside (X-gal) と isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で青色のコロニーを、一方、正常のlacZ geneに戻らなかったpUC19Mは、白色コロニーを形成するので鑑別が容易で、変異導入率の計算が可能となる。

(4) プラスミドへの変異の導入

プライマーのミスマッチを利用する方法である。0.5 mLのマイクロチューブ①②③に10×annealing buffer 2 μ L, 0.05 μ g/ μ L plasmid DNA (①, ② ; target or ③ ; control) 2 μ L, 0.05 μ g/ μ L selection primer (①, ②; *Hind* III M , ③; control-1) 2 μ L, 0.05 μ g/ μ L mutagenic primer (①; γ 153Cys→Arg, ②; γ 153 Cys→Ala, ③;control-2) 2 μ L, 水12 μ Lを加えて、100℃に3分間置き、ただちに5分間氷冷した。この間にプラスミドのdenatureと同時にprimer annealingが完了する。そこへdNTPを含む10×synthesis buffer 3 μ L, T4 DNA polymerase (2–4units/ μ l) 1 μ L, T4 DNA ligase (4–6units/ μ l) 1 μ L, 水 5 μ Lを加え、37℃に2時間置いて変異DNAを合成し、70℃に5分間置いて反応を停止させた。

(5) 制限酵素処理による変異プラスミドの選択

①, ②の反応液に1 μ Lの12 U/ μ L *Hind* IIIと③に1 μ Lの 20 U/ μ L *Nde* Iを加え、37℃に2時間置いた。Selection primer (*Hind* III M or Control 1) により変異が導入されたプラスミドは、また同時にmutagenic primersによる目的の変異が導入される確率が高いことが知られている。制限酵素による切断部位に変異が導入されたプラスミドは、制限酵素で切断されないために環状構造を維持しているが、変異の導入されなかったプラスミドは制限酵素により切断されて直線状になってしまう。前者のプラスミドは後者に比べて、100倍以上高いtransfection効率を得られることが知られている。

(6) First transformation

a) *Transformation step* ; 100 μ L *E.coli* BMH 71-18 *mut* S competent cells solutionと①, ②, ③それぞれの10 μ L mutated plasmid solutionをあらかじめ冷やして

おいた5 mLチューブにいれ、20分間氷冷し、次に42℃に1分間置いた。

b) *Recovery step* ; 直ちに1 mL LBブロスAmp (-) を加えて37℃で60分間220 rpmで振とう培養した。

c) *Amplification step*; 4 mL LBブロスAmp (+) を加えて37℃, 220 rpmで1晩振とう培養した。

d) *Transformation* 効率 ; 10 μ L mutated plasmid solutionの代わりに10 μ Lの既知濃度 (0.05 μ g/ μ L) の pMLP- γ solutionを同様の操作で transformationした。この recovery mediumをLBブロスで5倍と10倍に希釈し、100 μ LをLB寒天培地Amp (+) に接種した。1晩培養して生えたコロニー数をかぞえ、plasmid DNA 1 μ g当たりのコロニー数を求めたところ 0.9×10^6 / μ g DNAであった。キット説明書によると Chemical transformationの場合、 1×10^6 / μ g DNA以上の効率が望ましいとされる。

e) *Mutation* 効率 ; Recovery stepの段階でcontrol (pUC19M) transformation mixture 100 μ Lを採り、40 μ Lの20 mg/mL X-gal solution, 20 μ Lの20 mM IPTGを加えて、LB寒天培地Amp (+) へ接種し、37℃で1晩培養した。変異が導入されたプラスミドをもつ *E. coli*の青色コロニーが14、変異が導入されなかったプラスミドをもつ *E. coli* の白色コロニーが21であり、mutation効率は40%であった。

(7) プラスミドDNAの精製

First transformation後1晩振とう培養した *E. coli* BMH71-18*mut* SからQiagen Plasmid Maxi Kit (mini prep method) を用いてplasmid DNAを抽出し、精製を行った。培養液を2,000 rpm, 10分間遠心し、上清を除去した。沈殿物にP 1 (50 mM Tris-HCl緩衝液 pH8.0, 10mM EDTAとRNaseを含む) を0.3 mL加えてボルテクスミキサーで均一化し、マイクロチューブに移した。そこにP 2 (1% SDSを含む200mM NaOH, 1% SDS) を0.3 mL加えてよく振って混ぜ、室温に5分間置き、細菌を溶解させた。次に中和試薬P 3 (3.0 M potassium acetate, pH 5.5) を0.3 mL加えて10秒強く振って混ぜ、14,000 rpm15分間4℃で遠心した。プラスミドを含む上清をマイクロチューブ2本に移し、等量のフェノール溶液 (フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1) を加え、ゆるやかに攪拌した後、14,000 rpm 1分間遠心し、上清を新しいマイクロチューブに採った。これに0.8倍量のイソプロパノールを加えて、プラスミドDNAを析出させ、14,000 rpm 5分間遠心した。上清を除去して風乾

し、95%エタノールで洗浄した後、speedvacで5分間乾燥後、40 μ LのTE bufferに溶解した(①', ②', ③'とする)。

(8) 変異プラスミドの選択

精製したプラスミドを再度 *Hind*III で処理した。この段階で、混入している変異が導入されていないプラスミドは切断されて直線状となり、transformation効率が低下する。

(9) Second transformation

a) *Transformation step* ; 100 μ L competent *E.coli* DH 5 α cells solutionと各5 μ L digested plasmid solution (①', ②', ③') およびpMLP- γ の75倍希釈液 (④) を、あらかじめ冷やしておいた5 mLチューブのそれぞれにいれ、20分間氷冷し、次に、42 $^{\circ}$ Cに1分間置いた。

b) *Recovery step* ; 直ちに1 mL LBブロスAmp (-) を加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間220 rpmで振とう培養した。

c) 寒天培地への接種 ; ①', ②', ③'の各溶液を10倍、100倍希釈し、100 μ LずつをLB 寒天培地Amp (+) へ接種し、一晚培養した。対照の④については2倍、20倍希釈したものを100 μ Lずつ接種した。

d) *Second transformation* および *mutation* 効率 ; First transformationの場合と同様に求めたところ、それぞれ 1.2×10^6 / μ g DNAと84%であった。

(10) プラスミドDNAの精製

LB寒天培地Amp (+) 上のコロニーをそれぞれ7個ずつ選択し、5 mL LBブロスで振とう培養した (153R1-R7, 153A1-A7)。それぞれのブロスから100 μ Lずつを採取して冷蔵保存し、残液から(7)と同様の方法でプラスミドDNAを抽出し、精製した(ただし、フェノールクロロホルム抽出ステップは省略)。さらに混入したRNAを除去するために、プラスミド溶液と等量のPEG solution (13% polyethylene glycol と5 M NaCl の 43 : 7 混合液) を加えて混和し、15分間氷冷した。その後14,000 rpm 15分間4 $^{\circ}$ Cで遠心し、上清を除去した後、沈殿を1 mLエタノールで洗浄し、speedvacで7分間乾燥後、40 μ LのTE bufferに溶解した。

(11) 制限酵素処理による変異プラスミドの選択

5 μ Lの精製プラスミドに10 \times buffer 2 μ L, 水12 μ LとHind III 1 μ Lを加えて, 37 $^{\circ}$ Cに1時間置き, 反応させた後, 1%アガロースで電気泳動した. この結果HindIIIで切断できなかつたもの, すなわち変異が導入された確率は, γ 153Rで86% (6/7), γ 153Aが71% (5/7)であった.

(12) DNA濃度の測定

(11)においてHind IIIで切断されなかつたプラスミドからそれぞれ4クローンを選択して, 150倍希釈し, 260 nmにおける吸光度からDNA濃度を測定した. γ 153Rでは575–956 μ g/mL, γ 153Aでは406–856 μ g/mLであった.

(13) 塩基置換の確認

DNA濃度を測定した4クローンについて, 目的の塩基置換が生じているかどうかを確認するためにプラスミドDNAのシーケンスを実施した. その結果, γ 153Rでは3/4, γ 153Aでは2/4において変異導入が確認できた. このうちの γ 153RのクローンNo.5と γ 153AのクローンNo.2を選んで, プラスミドに組み込まれたフィブリノゲン γ 鎖cDNAの全長のシーケンスを行ない, 目的以外の塩基配列に異常がないことを確認した. 以上のシーケンス反応には次の4本のプライマーを用いた.

f1: 5'-AATTGTCGACCGCGGCC-3', f2: 5'-GACGCTGCTACTTTGAAG
TCC-3', r1: 5'-AACCTCTACAAATGTGGTATGGCT-3', r2: 5'-TTG
TCACTAGGATCATCGCC-3'

(14) 変異プラスミドの増幅

γ 153RのクローンNo.5と γ 153AのクローンNo.2について, 冷蔵保存してあつた100 μ L培養液を10 mL LBブロスAmp (+)に入れて1晩振とう培養した. このうち5 mLは2,000 rpm10分遠心し, 50%グリセロール200 μ Lに浮遊させ, -80 $^{\circ}$ Cで保存した. 残りの5 mLは500 mL LBブロスに入れ, 37 $^{\circ}$ C1晩振とう培養した.

(15) プラスミドDNAの精製(final)

500 mL LBブロスで培養したクローンの細菌から, Qiagen Maxi Kitによりプラスミドを精製した. 250 mL2本ずつに分けた培養液を3,500 rpm, 4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心した後, ペレットをP1に浮遊させた. 50 mLの遠心ボトルに移して10 mLのP2を加え, 強く振って混和し, 5分間静置した. さらに10 mLのP3を加えてから氷中に

20分間置き, 16,500 rpm, 4 °Cで30分間遠心した. 上清をQiagen tip 500のカラムに全量通過させた. QC溶液で2回洗浄し, QF溶液で溶出した. 溶出された溶液に0.7容のイソプロパノールを加えプラスミド DNAを析出させ, 80%エタノールで洗浄しクリンベンチ内で乾燥した後, 200 μ LのTE buffer (10mM, pH 8.0) に溶解した.

(16) DNA濃度の測定と電気泳動による確認

260 nmにおける吸光度から, 精製プラスミドの濃度を測定したところ, γ 153Rが863 μ g/mL, γ 153Aが578 μ g/mLであった. また0.5 μ Lずつを1%アガロースゲルで電気泳動し, 目的プラスミドの塩基対数であることとRNAの混在がないことを確認をした. これらの変異プラスミドはpMLP- γ 153RおよびpMLP- γ 153Aと呼ぶこととし, オリジナルなpMLP- γ (Cys)は, pMLP- γ 153Cと呼ぶこととした.

[2] 発現細胞へのベクターの導入と細胞培養

1) 発現細胞の準備

Chinese hamster ovary \cdot A α /B β cell (CHO \cdot A α /B β cell) は, Dr. S. T. Lordより提供を受けた哺乳動物細胞で, 正常なフィブリノゲンA α 鎖およびB β 鎖を発現するプラスミドpMLP-A α とpMLP-B β , およびneomycin耐性遺伝子のプラスミドであるpRSV-neoを組み込んだものである. その細胞を直径 10 cmのディッシュを用いて Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)-Ham's nutrient mixture F12 (F12) pH 7.4 に5% bovine calf serum (Hyclone Laboratories) /5% Nu-serum (Becton Dickinson) /10 IU/mL penicillin /10 mg/mL streptomycinを含む培養液 (medium 1) で培養した. 以下, 培養はすべて37°C, 5%CO₂下で行った. 続いて400 μ g/mL G418(neomycin analog, GIBCO) の入った培地 (medium 2) に変えて1週間-10日間培養した. なお, CHO \cdot A α /B β cellは, 継代培養を続け, 一部は対照として用いた.

2) Transfection

a) DNA \cdot CaCl₂ mixture ; CHO \cdot A α /B β 細胞にリン酸カルシウム共沈殿法により, 各pMLP- γ と histidinol耐性プラスミドpMSV-hisを導入した. 3本の15 mLチューブに2.5 M CaCl₂ 50 μ L (final concentration; fc=0.25 M) ずつと, それぞれpMLP- γ 153C 15 μ L (fc=17 μ g), pMLP- γ 153R 20 μ L (fc=17 μ g), pMLP- γ 153A 30 μ L (fc=17 μ g), およびpMSV-his 1 μ L (fc=1.3 μ g) ずつを入れ, 水で500 μ Lとして混和

し、DNA・CaCl₂ mixtureとした。

b) *DNA・CaPO₄ complex* の形成； 500 μL 2×HEPES buffered saline (16.4 g NaCl, 11.9 g HEPES acid, 0.21 g Na₂HPO₄/L) を3本の50 mLチューブに採り、同時にbubbleを吹き込みながらDNA・CaCl₂ mixtureを滴下し、混和後、20分間静置した。

c) *Transfection*； CHO・Aα/Bβ細胞のプレートに、DNA・CaPO₄ complex溶液を1滴ずつ滴下し、ゆっくりゆらして拡散させ、4時間培養した。

d) *Glycerol shock*； CHO細胞のプレートの培養液を吸引除去し、2 mLの10% glycerol/medium 1を加えた。3分間静置した後、吸引除去し、5 mL PBSで2回洗浄し、medium 2を10 mL加えて培養した。このステップによりプラスミドが細胞内に取り込みやすくなるとされる。

このようにしてトランスフェクトしたCHO細胞を、それぞれ、γ153C, γ153R, γ153Aとした。

3) 発現細胞の培養

Transfection (Tf) 2日後に、medium 2を400 μg/mL G418と2.5 mM histidinol (Aldrich) を添加した培地 (medium 3) に交換した。pMSV-hisを取り込んだCHO細胞は、pMSV-hisよりも10倍濃度でTfした各変異pMLP-γをも取り込んだ確率が高いことを前提としている。Tf後、3日目にTrypsin・EDTA (Sigma) で細胞をはがし、3枚の10 cmプレートに分けた。10日目ころからコロニーができ始め、20-25日目のコロニーを24ウェルプレートの各ウェルに移して培養を続けた (クローニング)。クローニングにはクローニングシリンダーを用い、その中にTrypsin・EDTA溶液2-5滴を入れてしばらく放置後、パスツールピペットで細胞をはがした。24ウェルプレートに移して12日以内に、ウェル底面の80%以上に増殖したクローンを、さらに直径6 cmのディッシュに継代培養した。6 cmのディッシュに継代できたクローンは、γ153Cで36クローンのうち29個、γ153Rで48クローンのうち41個、γ153Aで24クローンのうち14個であった。これらのうち、さらに12日間の培養でディッシュ底面の80%以上に増殖できたクローンを、6 cmのディッシュ5枚ずつにうえ継いだ。ここまで確立されたクローン (以下cell line) は、γ153Cで29個のうち12個、γ153Rで41個のうち13個、γ153Aで14個のうち6個であった。保存用の細胞はTrypsin・

EDTA溶液ではがしてから、medium 2で洗浄した後、10%DMSO (dimethyl sulfoxide) 添加medium (1) に浮遊させ、 -80°C で保存した。

[3] 培養液中および細胞内のフィブリノゲンの定量および観察

5枚の6 cmディッシュのうち、1枚目 (a) は継代培養に用い、2枚目 (b) は血清を含まないmedium 1に交換し1週間培養して培養液中のフィブリノゲンを解析した。3枚 (c, d, e) は、細胞内のフィブリノゲンの定量およびWestern blottingに使用した。

1) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法による定量

細胞内のフィブリノゲン定量は、(c)の細胞をリン酸緩衝液・生理的食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) で2回洗浄し、1 mLの Trypsin・EDTA溶液ではがしてマイクロチューブに採り、2,000 rpm 5分間遠心した。沈殿した細胞をPBSで2回洗浄し、PBS 30 μL に浮遊させてから、100 μL 0.1% IGEPAL CA-630 (nonionic detergent), 10 mM PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride, Sigma) /50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.0を加えてよく混和し、細胞膜を破壊した。測定前に2,000 rpm 5分間遠心し、上清を用いた。測定値はこの上清1 mL中の濃度として表わした。培養液中のフィブリノゲンの定量には、(b)の培養液を用いた。ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法は、96ウェルのマイクロプレートの内面に、一次抗体として抗ヒトフィブリノゲンウサギ抗体 (Cappel) を1,000希釈したものを120 μL ずつ分注し、吸着させて固相とした。一次抗体を吸着しなかったウェル内面を1%ウシ血清アルブミン/PBSで覆ってブロックした。そこへ検体を100 μL 入れて2時間反応させ後、除去し、ウェル内面を0.05% Tween 20入りのTris-borate緩衝液 pH 7.4で洗浄した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体ヤギ (Cappel) を10,000倍希釈して120 μL 加え、1時間反応させてから同様に洗浄した。そこへTMB POD SUBSTRATE溶液 (Kirkegaard Perry Lab.) 100 μL を加えて2分間反応させた後、1 Mリン酸を100 μL 加えて、反応を停止させた。発色は三光純薬SLEIA AUTO READERを用いて450 nmで測定し、標準曲線からフィブリノゲンを算出した。

2) SDS-PAGEとWestern blottingによる観察

細胞内および培養液中に分泌されたフィブリノゲン、 $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, γ の各ポリペプチド鎖の状態を、還元・非還元下でSDS-PAGEとWestern blotting¹⁹⁾により観察した。

サンプルは以下のようにして準備した。細胞内のものについては、(d), (e) の細胞をPBSで2回洗浄し、1 mLのTrypsin・EDTAで細胞をはがしてマイクロチューブに採り、2,000rpm 5分間遠心した。沈殿した細胞をPBSで2回洗浄し、それぞれ還元(2ME+) または、非還元(2ME-) のsample buffer 60 μ Lを加えてよく混和し、凍結と融解を3回繰り返して細胞を破壊した。分泌されたフィブリノゲンについては、(b) の培養液を採取し、それぞれ還元(2ME+)、非還元(2ME-) の等量のsample bufferと混和した。対照として、正常ヒト血漿から精製したフィブリノゲンを同時に泳動した。これらのサンプルは泳動前に5分間煮沸した。還元用の泳動には10%のポリアクリルアミドゲル、非還元用の泳動には8%のポリアクリルアミドゲルを用いた。ニトロセルロース膜に転写した後、1次抗体には抗ヒトフィブリノゲンウサギ抗体(DAKO) または抗ヒトフィブリノゲン γ 鎖ウサギ抗体(CML)、2次抗体にはアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体(EY)、発色には5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP)とnitro blue tetrazolium (NBT)を使用した²⁵⁾。

3. 結果

[1] ELISA 法による定量 (Table 6)

1) 細胞内のフィブリノゲン濃度は、 γ 153Cの12 cell lineは、 $1,134 \pm 810$ ng/mL, (range 330-3,200 ng/mL), γ 153Rの13 cell lineは、 31 ± 31 ng/mL (R-15, 29, 34, 38を除く9個では 41 ± 31 ng/mL:後述) (range <10-92 ng/mL), γ 153Aの6 cell lineは、 107 ± 121 ng/mL (range <10-346 ng/mL)であった。またCHO・A α /B β は <10 ng/mLであった。

2) 培養液中のフィブリノゲン濃度は、 γ 153Cの12 cell lineは、 $1,995 \pm 1,265$ ng/mL (range 230-4,800 ng/mL)であったが、 γ 153R, γ 153A, CHO・A α /B β はともにすべて、<10 ng/mLであった。

[2] SDS-PAGEとWestern blottingによる観察

1) γ 153Cの12個のcell lineでは、培養液中へ分泌されたフィブリノゲンは、還元、非還元ともに、正常の精製フィブリノゲンと同じパターンであった。一方、 γ 153R, γ 153Aでは、還元、非還元ともに、培養液中にフィブリノゲンおよびA α , B β , γ 鎖,

Table 6 Fibrinogen antigen levels determined by ELISA

Cell Lines	Cell Lysates (ng/mL)	Media (ng/mL)
γ 153C (n=12)	1,134 \pm 810(330-3,200)	1,995 \pm 1,265(230-4,800)
γ 153R (n=13)	30 \pm 31 (<10-92)	<10 (<10)
γ 153R (n=9*)	41 \pm 31 (<10-92)	<10 (<10)
γ 153A (n=6)	107 \pm 121(<10-346)	<10 (<10)
A α /B β (n=3)	<10 (<10)	<10 (<10)

The concentration of fibrinogen in the cell lysates or the conditioned media from transfected CHO cells were measured by ELISA described in Materials and Method. Data represent the mean \pm SD in numbers of CHO cell lines. Numbers in parenthesis mean the range of fibrinogen concentration.

*Number of clone after deletion of γ -chain plasmid nonincorporated clones.

あるいはそれらの分解物は全く検出されなかった (Fig. 15-A, D).

2) 非還元下で泳動した細胞内において、一次抗体に抗フィブリノゲン抗体を用いた場合には、 $\gamma 153C$ のすべてにフィブリノゲン、 $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖、およびそれらの分解物と思われるバンドが認められた。 $\gamma 153A$ のすべてと $\gamma 153R$ の13 cell lineのうち9個では、フィブリノゲンはほとんど認められなかったが、 $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖とそれらの分解されたペプチド断片が観察された (Fig. 15-B). 一次抗体に抗 γ 鎖抗体を用いた場合には、 $\gamma 153C$, $\gamma 153A$ のすべてと $\gamma 153R$ の9 cell lineで、精製フィブリノゲンと同じ位置に、バンドが2本ずつ認められた。このうち、高分子量側の1本は、易動度からみて $B\beta$ とおなじであること、CHO・ $A\alpha/B\beta$ のみの細胞にも存在すること、 γ と $B\beta$ 鎖の、特にC末端側のアミノ酸配列の相同性が42.4%と高いこと、などから、 $B\beta$ と交差反応したバンドであると思われた (Fig. 15-C).

3) 還元下で泳動した細胞内においては、一次抗体に抗フィブリノゲン抗体を用いた場合には、 $\gamma 153C$, $\gamma 153A$ のすべてと、 $\gamma 153R$ のcell lineのうち9個に $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖とそれらの分解されたペプチドが観察された (Fig. 15-E). 一次抗体に抗 γ 鎖抗体を用いた場合には、抗フィブリノゲン抗体を用いた非還元下の場合と同様の所見であった (Fig. 15-F).

4) 13 クローンの $\gamma 153R$ の残りの4 cell line (R-15, 29, 34, 38) は、一次抗体に抗フィブリノゲン抗体または抗 γ 鎖抗体を用いたどちらの場合にも、 γ 鎖を示すバンドは認められなかった。したがってこれらの4 cell lineは、 γ 鎖を発現していない細胞であると判断した。

5) CHO・ $A\alpha/B\beta$ の細胞内については、還元、非還元下とも、 $A\alpha$ 鎖と $B\beta$ 鎖のみが観察された (Fig. 15-B, C, E, F).

4. 考 察

Fibrinogen Matsumoto IV (M・IV) と同じ γ 鎖153残基のアミノ酸に変異を生ずるようなプラスミドを作製し、すでに $A\alpha$, $B\beta$ 鎖を発現しているCHO細胞に導入させて異常フィブリノゲンの発現を試みた。変異させた2種類の $\gamma 153R$, $\gamma 153A$ のcell lineでは、細胞内に $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖の3本のポリペプチドは観察されたものの、フィブリノゲンとして組み立てられたものはほとんど見られず、さらに培養液中には、

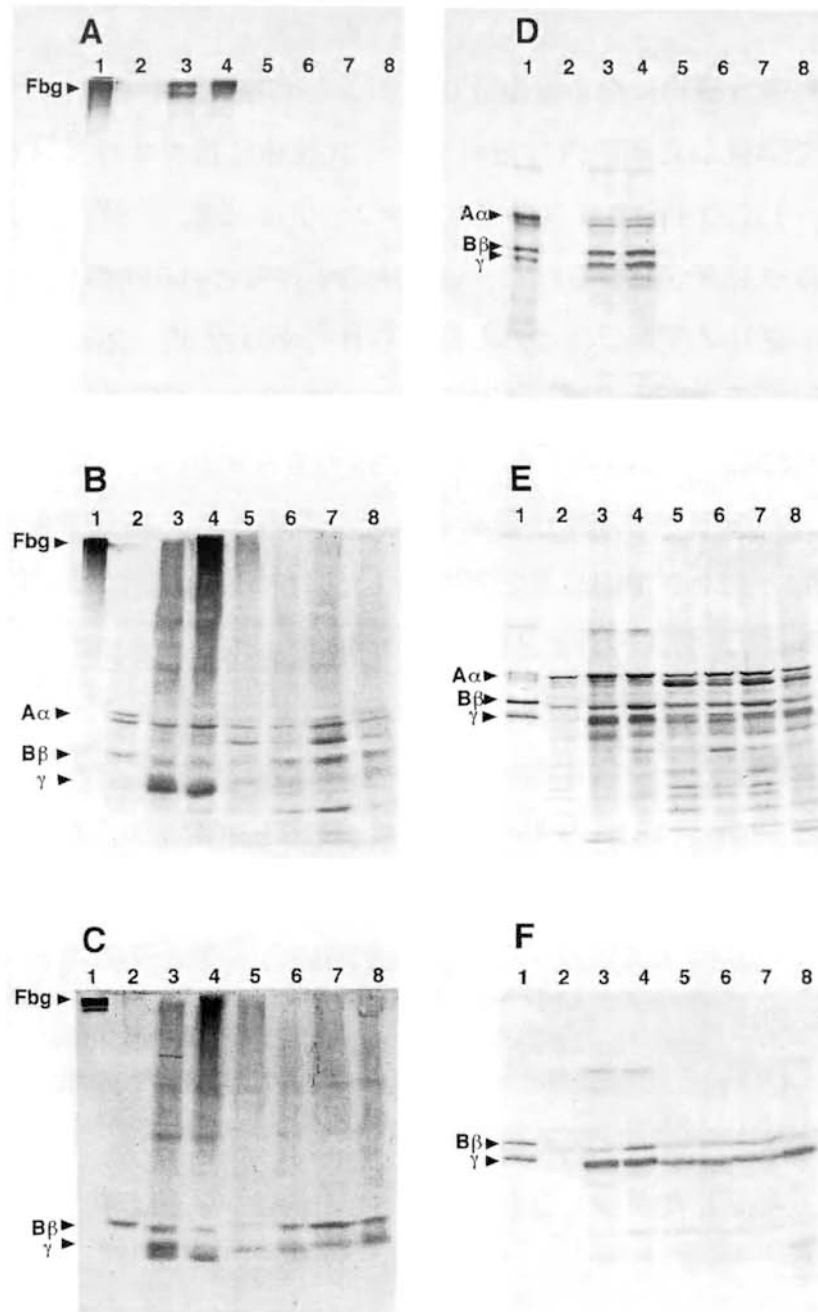


Fig. 15 Western blot analysis of fibrinogen in media (A and D) or CHO cell lysates (B, C, E and F) that were transfected with mutant or normal fibrinogen γ -chain plasmid. The samples were subjected to 8 % SDS-PAGE under nonreduced conditions (A, B and C) or 10 % SDS-PAGE under reduced conditions (D, E and F). After transfer to nitrocellulose membrane, blots were developed with a rabbit antihuman fibrinogen antibody (A, B, D and E) or a rabbit antihuman fibrinogen γ -chain antibody (C and F) that reacts to not only human fibrinogen γ -chain, but also to B β -chain. The samples in each figure were 1; purified fibrinogen from normal control plasma, 2; A α /B β CHO cells, 3; γ 153C-7, 4; γ 153C-16, 5; γ 153R-24, 6; γ 153R-32, 7; γ 153A-7, 8; γ 153A-11. Fbg, fibrinogen.

まったく分泌されていないことが判明した。一方、正常フィブリノゲンのcDNAである γ 153Cをもつクローンでは、細胞内でフィブリノゲンが生成され、培養液中にも分泌された。したがって、M・IVはフィブリノゲン γ 鎖153残基のCysがArgに変異したことに起因するフィブリノゲン欠損症であると確認した。

血液凝固・線溶の分野では、アミノ酸置換による血漿タンパクの欠損について、すでに多くの報告がある。M・IVと同様の、CysからArgへの置換による欠乏症の例としては、プロテインC¹⁸⁾、プロテインS¹⁹⁾、アンチトロンビンIII²⁰⁾などですでに報告がみられる。その中で、Sugaharaらは、哺乳動物細胞由来のCOS-7細胞によるプロテインC 331Cys→Argの発現実験を行い、変異タンパクの分泌不良(正常対照の0.3%)を確認している^{79,80)}。今回作製した γ 153R、 γ 153Aもともにリコンビナントのフィブリノゲンの分泌量は、 γ 153Cの0.5%以下であり、Sugaharaらの結果と同様であった。

最近のSpraggonら³⁵⁾によるフィブリノゲンDフラグメントの結晶構造の解析や、YeeらによるフィブリノゲンC末端のリコンビナント30 kDの分子による研究など⁶⁹⁾から、 γ 153Cysは同一 γ 鎖上の182CysとS-S結合していることが確かめられている。それらの研究によると、このS-S結合はフィブリノゲン分子のC末端側の構造を維持する上できわめて重要な部位であることが推測される。したがって、 γ 153Cysが別のアミノ酸に変異したことにより S-S結合が形成されなくなり、フィブリノゲンの立体構造を大きく変えてしまうことは十分に考えられる。

ところが異常フィブリノゲンにおいては、1塩基置換によって新たにストップコドンが生ずるなどにより、正常のフィブリノゲンよりも短い鎖が作られている例がいくつか報告されている。例えば、1つのnonsense mutationによりA α 鎖(本来625残基)が460番目のアミノ酸までしかないもの(Marburg)⁸¹⁾、A α 鎖がframeshift mutationのために、270番目までのもの(Otago)⁸²⁾、453番目までのもの(Milano III)⁸³⁾、479番目までのもの(Lincoln)⁸⁴⁾、547番目までのもの2例^{85, 86)}などである。また、B β 鎖でもエクソン2がスキップしてしまい、9-72番のアミノ酸を欠いたもの(New York I)⁸⁷⁾の1例などがある。Marburg、Milano IIIにおいてはA α 472Cysがないために、同じA α 鎖上の442Cysと472CysのS-S結合を欠き、そのため442 Cysは、血漿中のアルブミンと新たなS-S結合を生じている。またNew York Iにおいて

はB β 65Cysを欠くことから、B β 65CysとA α 36Cysとの間のS-S結合が形成されていない。しかしこれらの異常フィブリノゲンは、S-S結合の欠落にもかかわらず、いずれも肝細胞で生成された後、血液中に分泌されている。また、A α 鎖251残基以後のアミノ酸を欠いたりコンビナントフィブリノゲンも分泌されることが証明されており⁸⁸⁾、これら γ 鎖C末端領域の構造異常の場合との差異は、A α 鎖のC末端側の構造が比較的単純な立体構造をとっていることと関係があるものと考えられる。

第2項 異常フィブリノゲン(Fibrinogen Matsumoto IV)の細胞内における 動態解析

1. Pulse-chase analysis

[1] 緒言

フィブリノゲン γ 鎖の153Cysを, ArgあるいはAlaに変異させたプラスミドを導入し, 発現させたCHO細胞の培養液中には, フィブリノゲンおよびフィブリノゲンの分解物がまったく検出されなかったことから, Fibrinogen Matsumoto IV(M・IV)は, この変異により引き起こされたフィブリノゲン欠損症であることは明らかとなった. しかし, Western blottingにより, 細胞内には $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖のポリペプチドの存在は認められたことから, 細胞内で構造異常を認識する何らかのメカニズムが働いて, ポリペプチドからフィブリノゲンへの組み立てが障害されてしまうのか, あるいは組み立てられたとしても異常なタンパクとしてすみやかに分解されてしまい, 細胞外には分泌しないことが考えられた.

フィブリノゲンは, 分子量 67 kDa (A 鎖), 57 kDa ($B\beta$ 鎖), 47.5 kDa (γ 鎖) の3種類のポリペプチド鎖が2本ずつS-S結合した6本鎖により1分子が形成されるという非常に複雑な構造をしており, 細胞内での生成過程や動態はほとんど明らかにされていない. γ 153Cysの変異はS-S結合を欠くというフィブリノゲンの立体構造にとってドラマティックな構造変異をもたらすことが示唆され, 細胞内でのタンパクの折りたたみ (folding) 過程に影響を与え, 細胞内輸送における異常, あるいは分解の亢進, 分泌の低下などを招くものと考えられ, γ 鎖153Cys-182CysのS-S結合は, フィブリノゲンの細胞外への分泌にとってきわめて重要な部位であることが示された. そこでM・IVの3種類のポリペプチド鎖が, 会合, 結合・組み立て, 輸送, 分泌にいたる過程においてどのような状態で存在するのかを観察し, フィブリノゲン欠損症を呈する機序を明かにするために, pulse-chase analysisを行った.

[2] 材料および方法

1) 発現細胞の前処理

γ 153C-14, γ 153R-24, γ 153A-10の3つのcell lineを選択し, 直径6 cmのディッシュにそれぞれ14枚ずつ, 細胞がほぼディッシュいっぱい増殖するまでmedium 3

で培養した。前日にG418とhistidinolを含まないmedium 1に交換し、16時間培養した。

2) L-[³⁵S]-メチオニンによるラベリング(pulse)

細胞をPBSで2回洗浄した後、3 mLのmethionine-free DMEM (GIBCO-BRL)で37℃ 30分間インキュベーションした。それぞれ9枚ずつのディッシュの培養液を除去し、1 mLの1.5 MBq (40 μCi) L-[³⁵S]-メチオニンを含むmethionine-free DMEMに交換してから、5% CO₂下で37℃ 60分間インキュベーションした(60' pulse)。同様の操作により、残りの5枚ずつのディッシュは、1 mLの2.2 MBq (60 μCi) L-[³⁵S]-メチオニンを含むmethionine free-DMEMに交換してから、3分間インキュベーションした(3' pulse)。

3) ラベリングされたフィブリノゲンの追跡(chase)

a) 細胞抽出液の作製および培養液の採取； Pulse後、ただちに各ディッシュをPBSで2回洗浄し、20mM L-メチオニンを含むDMEM 1 mLを加えた。60' pulseの場合には0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24時間後の各時点で、細胞および培養液を採取した。一方、3' pulseの場合には、0, 5, 10, 20, 60分後の各時点で細胞を採取した。細胞は、培養液を除去した後、60' pulseでは1 mL Trypsin-EDTAで剥がしてから1.5 mLのマイクロチューブへ採取し、5,000 rpm 2分間遠心した。冷PBSで2回洗浄した後、120 μLのlysis buffer (1% IGEPAL CA-630, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM PMSF)を加えてピペッティングにより十分に混和し、氷中に30分間静置した。3' pulseでは、500 μLのlysis bufferを加えて、ただちにスクレーパーでかき採って、1.5 mLのマイクロチューブへ入れてピペッティングにより十分に混和し、氷中に30分間静置した。培養液は2,000 rpm 5分間遠心し、上清を用いた。

b) *Immunoprecipitation* ; 培養液および細胞内のフィブリノゲンを回収するために、抗フィブリノゲン抗体によるimmunoprecipitationを行った。2,000 rpm 5分間遠心した培養液、および氷中に30分間静置してから10,000 rpm 5分間遠心した細胞抽出液を、100 μLずつマイクロチューブへ採取した。そこへ500倍希釈した抗フィブリノゲン抗体 (DAKO) を100 μLずつ加えて混和し、4℃で一晩静置した。形成されたフィブリノゲンの抗原・抗体沈降物を回収するために、200μLのprotein A-Sepharoseを加えて、37℃で30分間攪拌し、抗原・抗体・protein A-Sepharose

complexを形成させた。0.05% IGEPAL CA-630を加えた PBSで3回洗浄した後、30 μ Lの非還元用の SDS-PAGE sample buffer (2ME-) に溶解した。また、60' pulseではそれぞれ3時間chaseの細胞内のものについて、3' pulseでは全サンプルについて、還元用 sample buffer (2ME+) にも溶解した。

c) **フィブリノゲンの確認**； 6時間chaseの時点で、もう1枚のディッシュから同様にして培養液と細胞抽出液を採取し、その100 μ Lずつに過剰のフィブリノゲン (90 μ g) を添加した。その後 immunoprecipitationを行って、細胞内で生成されたフィブリノゲンと、添加したフィブリンとの間で抗原・抗体反応を競合させ、添加したフィブリノゲンによる阻害の有無により抗フィブリノゲン抗体の特異性を観察した。

d) **SDS-PAGEによる分離**； サンプルは5分間煮沸した後、4-12%のグラジエントポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。分子量サイズマーカー、または正常の血漿から得た精製フィブリノゲン (還元・非還元) を同時に泳動し、Coomassie Blue R-250による染色・固定を行った。

e) **Radioactivity の検出**； タンパク染色後のゲルをゲルドライヤーでフィルム状に乾燥した後、Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS 1500 System (Fuji Photo Film) により、タンパク中に取り込まれた [³⁵S] の radioactivityを検出した。

[3] 結果

1) 60' pulse

(1) γ 153Cの細胞内には、分子量 340, 288, 234, 195, 180 kDaのバンドが検出されたが、A α , B β , γ 鎖は観察されなかった。また、 γ 153Cの培養液には、0から24時間へ時間の経過とともに濃くなっていく、分子量340 kDaのバンドが認められた (Fig. 16-A)。

(2) Immunoprecipitationの反応特異性を確認するために、正常血漿から精製したフィブリノゲンを過剰に加えて、抗原・抗体反応を阻害させたところ、 γ 153Cの 340, 288, 234 kDaのバンドは消失したことから、これらのバンドは、フィブリノゲン由来のタンパクであることは明らかであった (Fig. 16-A Inh)。

(3) γ 153R, γ 153A の細胞内には、分子量340, 288, 234 kDaのフィブリノゲン

由来のバンドは認められなかった。しかし泳動原点には、 γ 153Cの細胞内よりも濃いバンドが残っていた。一方、培養液にはバンドは観察されず、まったく分泌されていないことが確認できた (Fig. 16-B)。

(4) 還元下で泳動したパターンでは、 γ 153Cの340, 288, 234 kDaのバンドは消失し、精製フィブリノゲンのA α , B β , γ 鎖と同じ位置にバンドがみられた。またフィブリノゲン由来のバンドが認められなかった γ 153R, γ 153Aの細胞内にも、A α , B β , γ 鎖と同じ位置と190 kDa付近にバンドが出現した (Fig. 17)。

(5) 細胞内に認められる、39 kDa付近のバンドは、 γ 153Cよりも γ 153R, γ 153Aの場合のほうが濃かった。しかし、これらは過剰に添加したフィブリノゲンによる阻害は受けなかった (Fig. 16-A Inh)。

2) 3' pulse (Fig. 18)

(1) 非還元下では、 γ 153Cの細胞内には、10分後から340, 234, 56, 39 kDaのバンドが出現し、60分に向かって次第に濃くなっていた。 γ 153R, γ 153Aには56, 39 kDa および、 γ 153Cより濃い泳動原点のバンドが観察された。

(2) 還元下の5-60分では、 γ 153Cの細胞内では、A α , B β , γ 鎖および234, 39 kDaのバンドが認められた。 γ 153R, γ 153Aでは、A α , B β 鎖および234, 39 kDaのバンドが認められたが、 γ 鎖はわずかに認められる程度であった。いずれも0分では γ 鎖と同じ位置に1本と、A α , B β 鎖より高分子側に2本のバンドが観察された。しかし、非還元の場合にみられた泳動原点の濃いバンドは、すべてのレーンで消失していた。

2. メッセンジャーRNA量の半定量的RT-PCR法による確認

1) 緒言

Pulse-chaseの結果、 γ 153R, γ 153Aの細胞内にはフィブリノゲンA α , B β 鎖は γ 153Cとほぼ同程度存在していたが、 γ 鎖はよく観察できなかった。そのために γ 鎖の発現量を調べるひとつの方法として、半定量的RT-PCRを行なった。各cell lineからRNAを抽出し、濃度一定にした希釈系列を作成した。それらを逆転写反応によりcDNAとし、 γ 鎖と、対照としてすべての細胞に普遍的に発現されているglyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) のPCRを行ない、産物の生成量を比較した^{89, 90}。

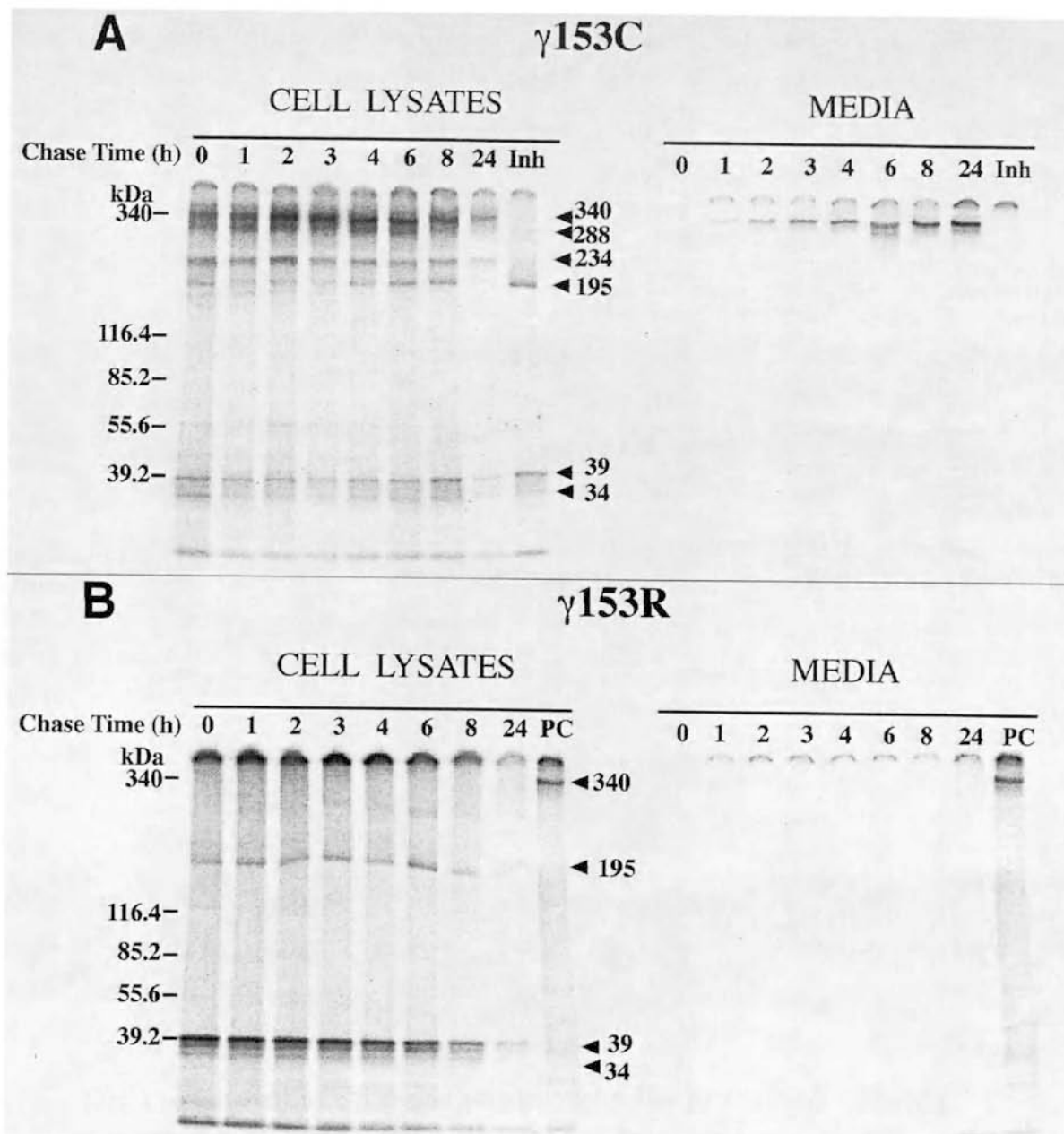


Fig. 16 Analysis of pulse-labeled fibrinogen in the transfected CHO cells. The cells were pulse-labeled for 60 minutes with [^{35}S] -methionine and chased for the indicated period with an excess of unlabeled methionine. The recombinant fibrinogen and/or 3 polypeptides of fibrinogen were then immunoprecipitated from the cell lysates or the conditioned media with a rabbit antihuman fibrinogen antibody and protein A-Sepharose. The immunoprecipitates were subjected to electrophoresis on 4% to 12% gradient SDS-PAGE under nonreducing conditions and autoradiography. Lane Inh in (A) included the addition of purified plasma fibrinogen to the reaction mixtures of the 6-hour chase experiment to demonstrate the antibody specificity. Lane PC in (B) was the conditioned medium at the 6-hour chase of $\gamma 153\text{C}$ as a positive control.

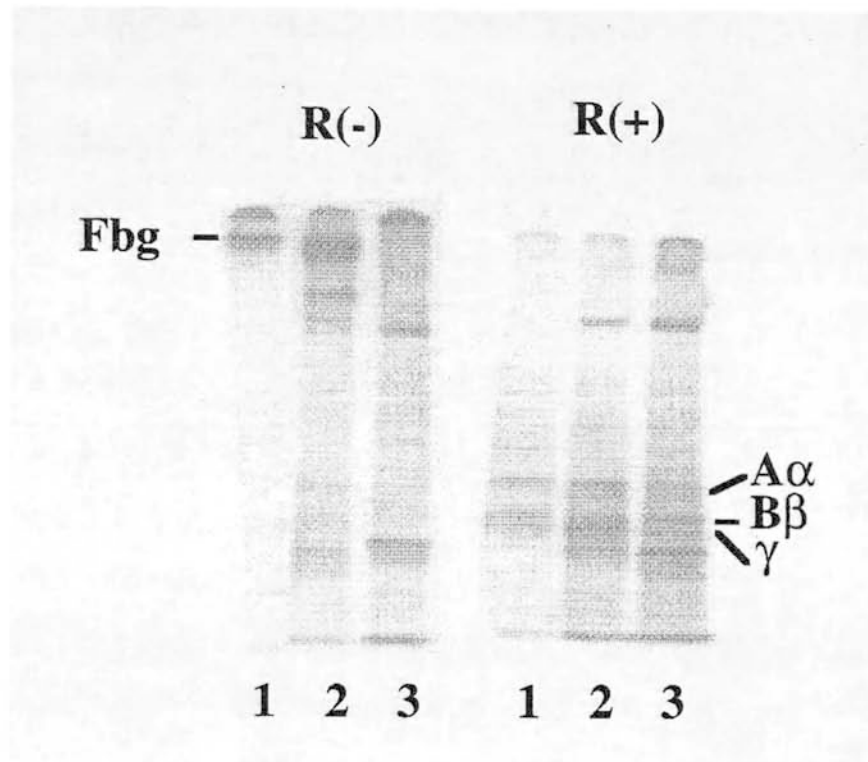


Fig. 17 Analysis of pulse-labeled fibrinogen in the transfected CHO cells. The cells were pulse-labeled for 1 hour with [^{35}S] -methionine and chased for three hours with an excess of unlabeled methionine. The recombinant fibrinogen and/or 3 polypeptides of fibrinogen were then immunoprecipitated from the cell lysates or the conditioned media with a rabbit antihuman fibrinogen antibody and protein A-Sepharose. The immunoprecipitates were subjected to electrophoresis on 4% to 12% gradient SDS-PAGE under nonreducing and reducing conditions and autoradiography. 1; γ 153C-14 medium, 2; γ 153C-14 cell lysate, 3; γ 153R-24 cell lysate.

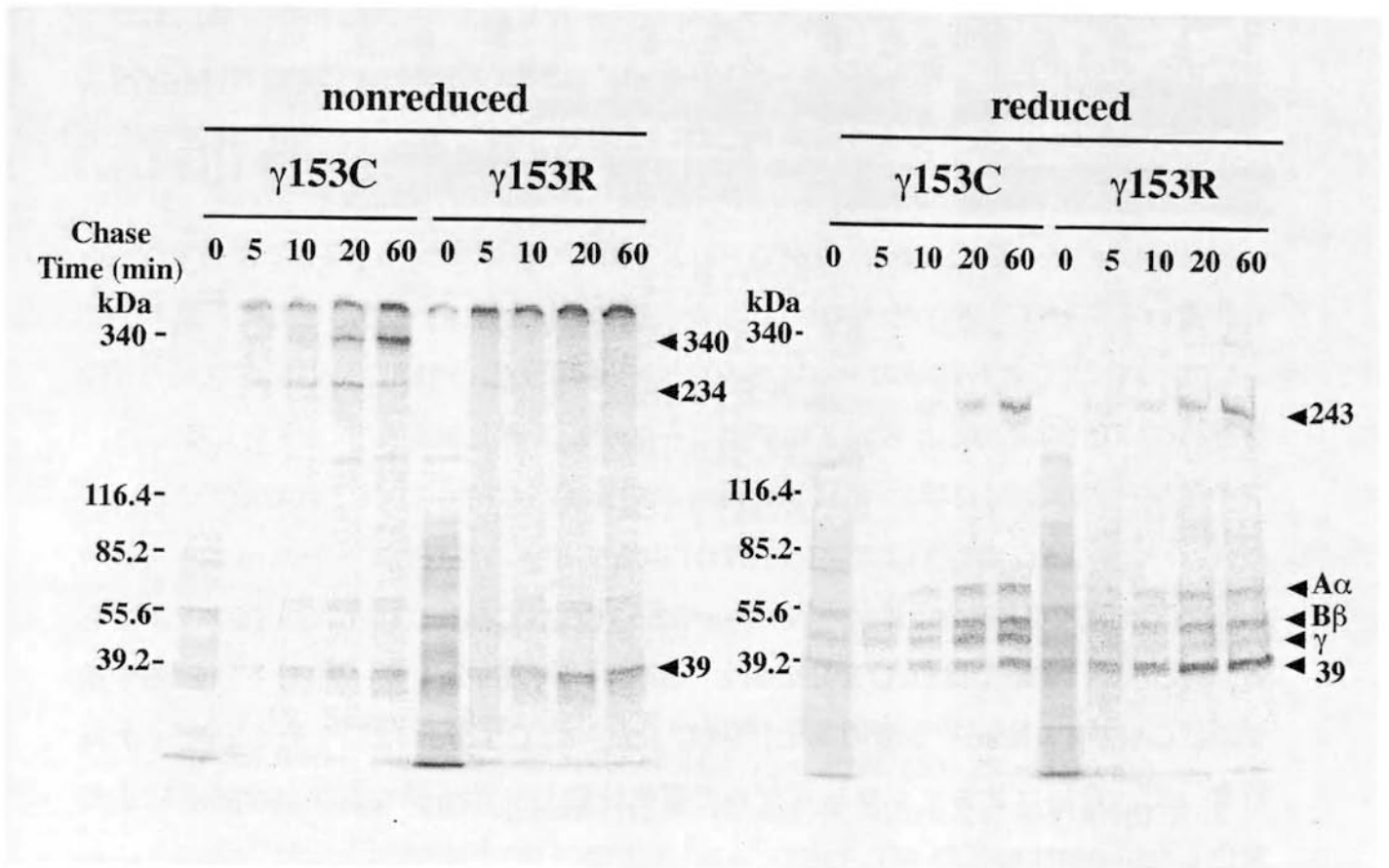


Fig. 18 Analysis of pulse-labeled fibrinogen in the transfected CHO cells. The cells were pulse-labeled for 3 minutes with [^{35}S] -methionine and chased for the indicated periods with an excess of unlabeled methionine. The immunoprecipitates from the cell lysates were subjected to electrophoresis on 4 % to 12 % gradient SDS-PAGE under nonreducing or reducing conditions and autoradiography.

2) 方法

A α /B β , γ 153C-14, γ 153C-8, γ 153R-24, γ 153A-10 の各cell lineから, Isogen LSを用いてRNAを抽出した. まず細胞をTrypsin-EDTAではがし, 滅菌PBSで洗浄後, 4 μ L 2-メルカプトエタノール, 60 μ L 2 M 酢酸ナトリウム pH 4.0, 500 μ L Isogen LS, 200 μ L クロロホルム・イソアミルアルコールを加えて混和し, 氷冷した. そこに1 μ L グリコーゲン, 600 μ L イソプロパノールを加えて-20 $^{\circ}$ Cに1時間以上置いて, RNAを回収した. 得られたRNAは260 nmで濃度を測定し, 500, 200, 100, 50, 25, 10 ng/ μ Lとなるように希釈した. その10 μ Lに, 0.2 μ M oligo dTプライマー, 10 mM dithiothreitol, 0.5 μ L M-Moloney's murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RTase, GIBCO BRL)を加えて, 水で20 μ Lにしてから42 $^{\circ}$ C 60分間置いて逆転写反応させ, cDNAにした. このcDNA 1 μ Lを鋳型として γ 鎖エクソンVIII, IX, Xを含む領域の494塩基をPCRで増幅した. 同様にして反応させた452塩基のGAPDHの産物とともに2%アガロースゲルで電気泳動し, 濃度を比較した. プライマーの塩基配列は, γ 鎖 forward : 5'-ATGAGTTGGTCCTTGCACCC-3', reverse : 5'-AAG GT TCCTGGCACTGTGCTT-3', GAPDH forward : 5'ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3', reverse : 5'-TCCACCACCCTGTTGATGTA-3'である. 反応は, γ 鎖では96 $^{\circ}$ C 5分のあと, 94 $^{\circ}$ C 1分, 54分1分, 72 $^{\circ}$ C 1分を25サイクル, GAPDHでは96 $^{\circ}$ C 5分のあと, 94 $^{\circ}$ C 1分, 62 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分を25サイクル行なった. 産物は2%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドにより染色した.

3) 結果

フィブリノゲン γ 鎖, GAPDHともに, RNA濃度10 ng/ μ LまでPCR産物がバンドとして確認できた. γ 鎖, GAPDHともにRNA濃度が低下していくのに伴って, バンドは薄くなったが, その程度はGAPDHのほうが大きかった. また同一濃度の中では各クローン間のバンドの濃さには大きな差は認められなかった. これらの結果から, A α /B β , γ 153C-14, γ 153C-8, γ 153R-24, γ 153A-10の各cell lineのmRNA量に大きな差はないものと推定した (Fig. 19).

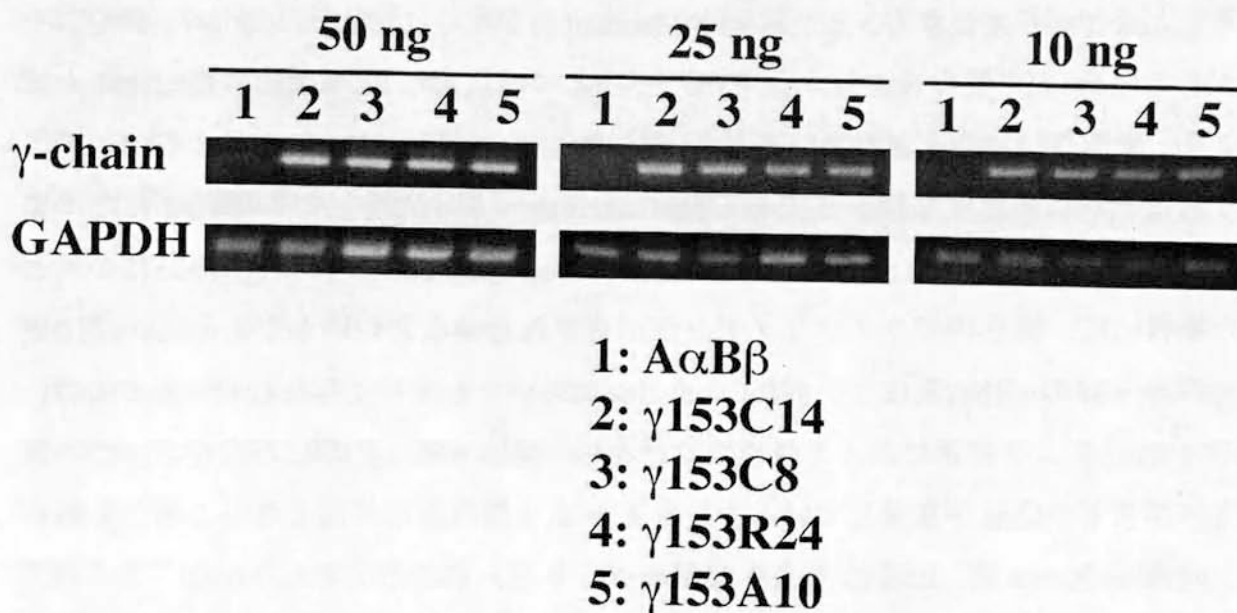


Fig. 19 Semiquantitative RT-PCR analysis of γ -chain mRNA expression in cell lines. Increasing amounts of total input RNA (50, 25 and 10 ng) from transfected CHO cell lines (γ 153C-14 and -8, γ 153R-24, γ 153A-10) were reverse transcribed and amplified for 25 cycles. The PCR products for the γ -chain (492 bp) and GAPDH primers (452 bp) were visualized by ethidium bromide staining with 2 % agarose gels. The samples in figure were 1; A α /B β CHO cells, 2; γ 153C-14, 3; γ 153C-8, 4; γ 153R-24, 5; γ 153A-10.

3. 考 察

ある血漿タンパクが血液中に存在しない、いわゆる欠損症を招く原因として、そのタンパクを生成する細胞内での生成不良、分解の亢進、細胞内輸送の異常、分泌段階での異常などのほか、分泌はされるものの、血液中において速やかに破壊されることなどが考えられる。Fibrinogen Matsumoto IVは、フィブリノゲン γ 鎖をコードしている1233個のヌクレオシドのただひとつの塩基がTからCに置換したことにより、細胞外には分泌されないことが、ELISA法やWestern blottingおよびそれらよりもはるかに高感度な検出法であるradioactivityを用いた方法でも確認された。また、 $[^{35}\text{S}]$ を用いたpulse-chase analysisの結果から、 γ 鎖153CysがArg, Alaに変異した場合には、細胞内でフィブリノゲンが形成されないことが明かであった。CHO細胞内の γ 鎖のmRNA量は、いずれのcell lineにおいても同程度存在していることは、RT-PCR法により確認した。これらのことから、変異 γ 鎖は非常に不安定で、この異常ペプチドの分解が亢進しているか、あるいは γ 鎖の利用が進まないことから何らかの機序で、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖よりも生成がゆっくりであることが考えられた。さらに、 $\gamma 153R$, $\gamma 153A$ の細胞内フィブリノゲンの泳動結果では、非還元下では大量にあった泳動原点の濃いバンドが、還元下ではほとんど消失し、それに代わって、 $\gamma 153C$ より少ない量の $A\alpha$, $B\beta$ 鎖、および γ 鎖が観察された (Fig. 17, 18)。このことは、 $\gamma 153R$, $\gamma 153A$ の細胞内において生成された $A\alpha$, $B\beta$, γ のポリペプチド鎖は、非常に高分子の異常結合物として存在しており、泳動原点の濃いバンドはこれらの結合物であることが考えられた。また、細胞抽出液において、正常フィブリノゲンの過剰添加による抗原・抗体反応の阻害によっても残る約195 kDaのバンド、あるいは還元した後も存在する約234 kDaのバンドが認められたが、これらについては現時点では解明できておらず、分子シャペロンの可能性も含めて、今後さらに追及していく予定である。

フィブリノゲンは3種類のポリペプチドが2本ずつ会合し、6本鎖からなる2量体の非常に複雑な構造をしており、細胞内での生成過程は現在まだ十分には解明されていない。しかし、Yuらによる最近の研究^{91,92)}では、細胞内に生成された $B\beta$ 鎖は $A\alpha$, γ 鎖より少量しか存在せず、フィブリノゲンとして組み立てられていく速度は $B\beta$ 鎖の生成速度に依存するとされている。この場合、新たに作られた $B\beta$ 鎖により

$A\alpha-B\beta$, $B\beta-\gamma$ が形成され, そこにそれぞれ γ と $A\alpha$ が S-S 結合して, $A\alpha-B\beta-\gamma$, $A\alpha-B\beta-\gamma$ となり, それらが最終的に 2 組ずつ結合した 6 本鎖の成熟したフィブリノゲンとなるとしている. 一方, Huang ら⁹³⁾ は, まず $A\alpha-\gamma$ と $B\beta-\gamma$ が形成されてから, そこにそれぞれ $B\beta$ と $A\alpha$ が結合して成熟したフィブリノゲンとなるとしており, いまのところ一致した見解には至っていないのが現状である. 私が行なった pulse-chase analysis の実験結果では, Yu らの仮説である $A\alpha-B\beta$ は, $\gamma 153R$, $\gamma 153A$, CHO · $A\alpha/B\beta$ の cell line には認められなかった. また, $\gamma 153R$, $\gamma 153A$ の cell line に生成された γ 鎖は異常な構造により速やかに分解されるために, Huang らの仮説である $A\alpha-\gamma$ と $B\beta-\gamma$ はこの二つの cell line には認められなかったものと考えられ, したがって Huang らの説を支持できるものであった.

Fbgrinogen Matsumoto IV は, 一塩基置換により γ 鎖 153Cys と 182Cys の間の S-S 結合が失われ, γ 鎖に著しい三次元構造の異常をもたらすものであった. 今回確立した cell line は, これと同じ構造異常をもつフィブリノゲンを生成するものであり, 正常なフィブリノゲン分子の生成・組み立て・輸送・分泌のメカニズムを解明していくうえで, 多くの情報を得ることができる有用な手段となるものと考えている.

総括

総 括

フィブリノゲンは、タンパクとしてはアルブミンについて古くから知られており、血漿中濃度が比較的高いことから、現在までにその性状、機能、構造などについて数多く解析がなされてきた。また、血漿中で溶解しているフィブリノゲンは、複雑な血液凝固機序の作用により重合が開始され、やがてフィブリン網を形成して目に見える凝集物となる、非常にユニークな機能をもつタンパクである。

私は、1992年から1996年までの5年間に、日常検査で測定された機能的測定法によるフィブリノゲン濃度と、免疫法で測定された濃度との間に乖離を示した3例と、二法による測定値がともに低値を示した1例を見出した。測定値の乖離からフィブリノゲン異常症が疑われた3例について、機能解析および遺伝子解析を行なったところ、1塩基置換に起因する1アミノ酸置換による異常症であることを確認したので、Fibrinogen Matsumoto I, II, IIIと命名した。また測定値がともに低値であることから欠損症の可能性を示した1例について、遺伝子解析を行なったところ、細胞内における生成・分泌の異常が示唆されたことから、異常フィブリノゲンを発現させて欠損を招く原因を検討した。その結果、細胞内におけるフィブリノゲンの生成異常が確認できたので、Fibrinogen Matsumoto IVと命名した。

本論の第1章では、フィブリノゲンの構造と機能、および異常フィブリノゲンについて述べた。また、これらの4例の研究ならびに実験に用いたタンパク解析と遺伝子解析のための検査法について、具体的に記述した。タンパク解析には、まず血液凝固検査として、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、機能的測定法および免疫法によるフィブリノゲンの定量を行なった。またSDS-PAGEとWestern blottingによりA α , B β , γ の3本鎖の分子量を観察した。機能検査としては、トロンビンによるフィブリノペプチドAおよびBの放出能と、フィブリンの重合反応の過程を観察するためにthrombin-catalysis fibrin polymerization (TCFP) 試験を実施した。また遺伝子解析ではフィブリノゲンをコードしているA α , B β , γ の3本鎖の全エクソン、イントロンおよび、エクソン-イントロン接合部のシークエンスを行なった。その結果、4例ともに1塩基置換の可能性が認められたことから、それぞれの塩基置換部位を含むDNA断片をPCRにより増幅し、その産物について

Matsumoto IとIIについてはサブクローニングし、Matsumoto IIIとIVについては制限酵素処理して塩基置換を確認したので、それらの手法についても述べた。

第2章では、Fibrinogen Matsumoto I, II, IIIについて、各解析法により得られた結果を示し、構造異常の部位と機能異常の程度あるいはタイプについて考察した。

Fibrinogen Matsumoto IIは γ 鎖364番アミノ酸がAsp (GTA) からHis (CTA) に置換していた。 γ 鎖364番アミノ酸は、フィブリノゲン分子のC末端側のD domainと呼ばれる領域に位置しているが、トロンビンの作用によりFPAが放出されたあとに、E domainと呼ばれるN末端側に露呈される重合基との結合に中心的な役割を果たすきわめて重要な部位である。したがって、このアミノ酸の変異はフィブリン重合反応の初期段階であるD-E結合を障害するものであり、TCFP試験においてlag timeの延長が認められた。さらに1 mMのカルシウムイオン添加によるTCFP試験でも、フィブリンのlateral aggregationが順調に進まないことを反映して、著しい重合速度の低下が観察された。

Fibrinogen Matsumoto IIは、 γ 鎖308番アミノ酸が、Asn (AAT) からLys (AAG) に置換していた。 γ 鎖308番アミノ酸近傍の318-324残基はカルシウム高親和性結合部位とされている。カルシウムはフィブリンの立体構造を維持することにより、フィブリンの重合反応を促進する機能をもっていると考えられているが、生理的濃度である1.0 mMのカルシウムイオンの存在下におけるTCFP試験では、Fibrinogen Matsumoto IIの重合反応の異常は軽度であった。

Fibrinogen Matsumoto IIIは、 γ 鎖275番アミノ酸が、Cys (CGC) からArg (TGC) に置換していた。フィブリノゲン異常症のうち γ 鎖275番アミノ酸の変異はもっとも高頻度に見られるが、いずれも著しい重合障害が報告されている。これは、 γ 鎖275残基がフィブリン重合反応におけるprotofibrilの形成に重要な機能をもつ部位であり、この残基の変異がD-D結合を障害し、protofibrilの形成を遅らせることから、重合反応開始までのlag timeが著しく延長するものと考えられた。しかし、Fibrinogen Matsumoto IIIはIに比べ、lag timeが長いにもかかわらず重合速度は大きかった。この結果から、フィブリンのD-E結合部位、とりわけD domain側の結合部位である γ 鎖364番アミノ酸近傍は、フィブリンのlateral aggregationに必須の重要な構造を有していることが強く示唆された。

第3章では、Fibrinogen Matsumoto IVについて、DNA上の変異部位の解析と、欠損症となる原因について検討した。Fibrinogen Matsumoto IVは、 γ 鎖153番アミノ酸が、Cys (TGT) からArg (CGT) に置換していた。この変異は、 γ 鎖153Cysと同じ γ 鎖上の182Cysとの間のS-S結合が形成されないことを示しており、 γ 鎖は著しい三次構造の変化を伴うことが推察された。この構造異常が欠損を招く原因となるのか明らかにするために、正常 γ 鎖cDNAをもつプラスミドから、 γ 鎖153CysがFibrinogen Matsumoto IVと同じ変異であるArgと、別のアミノ酸であるAlaに変化するような変異プラスミドを作製した。これらを正常A α 鎖、B β 鎖を産生している哺乳動物卵巣細胞由来のCHO細胞に導入し培養した(γ 153R, γ 153A)。また、対照として、正常 γ 鎖を発現するプラスミドについても同様にCHO細胞に導入した(γ 153C)。それらの細胞内および培養液中に分泌されたフィブリノゲン濃度の測定と、Western blottingによる観察を行った。その結果、 γ 153Rあるいは γ 153Aのcell lineの培養液からは、フィブリノゲンおよびその分解物は証明できなかった。すなわち細胞からは分泌されないことが確認できた。また γ 153Rと γ 153Aの細胞抽出液中のフィブリノゲンは、濃度としては γ 153Cの10%以下であり、Western blottingによる観察では3種のポリペプチドはあるものの、フィブリノゲンは観察されなかった。またこの変異をもつ異常フィブリノゲンの細胞内における状態をpulse-chase analysisを用いて解析したところ、細胞内にはフィブリノゲンは存在していないことが判明した。したがって、Fibrinogen Matsumoto IVは、1アミノ酸置換をもつ γ 鎖が原因であるフィブリノゲン生成異常に起因するフィブリノゲン欠損症であることを確認した。

現在までの、凝固関連因子あるいは他の血液中のタンパクに関する機能異常、欠損症の報告をみても、どのような構造異常が機能障害を示すことになるのか、あるいはタンパクの欠乏を招くことになるのか、そのメカニズムは明らかにされていないものが多い。しかし、フィブリノゲンのような複雑なペプチドから構成されるタンパクの細胞内での組み立て、輸送、分泌にとって、三次元の立体構造が重要な役割を有していると考えられる。今回私が確立したcell lineが、今後の研究に多いに役立つものと期待している。

謝 辭

謝 辞

本論文をまとめるにあたりまして、終始ご懇切なご指導、ご助言、ご援助を賜りました、信州大学大学院工学系研究科博士後期課程生物機能工学専攻教授・遺伝子実験施設長 岡崎光雄先生に衷心より感謝申し上げます。

本研究を推進するにあたり、多大なご指導、ご助言、ご援助を賜りました、信州大学繊維学部応用生物科学科遺伝子工学講座助教授 下坂 誠先生、信州大学遺伝子実験施設助教授 林田信明先生、The Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of North Carolina, Prof. S.T. Lord に深く感謝申し上げます。

また、本論文のご高見を賜りました、信州大学医学部教授 福嶋義光先生、信州大学大学院工学系研究科教授 兒玉 徹先生、同教授 関口順一先生、同助教授 藤井敏弘先生に厚くお礼を申し上げます。

いつもさまざまなお援助、ご協力をいただきました、信州大学繊維学部応用生物科学科 小平律子先生に心よりお礼を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なご指導、ご助言、ご協力を頂きました、信州大学医療技術短期大学部助教授 奥村伸生先生、信州大学医学部附属病院第二内科講師 北野喜良先生に深く感謝申し上げます。

また、遺伝子解析、血液検査等について、種々のご助言、ご協力、ご援助を頂きました、信州大学医学部臨床検査医学講座教授・附属病院中央検査部部长 勝山 努先生、同中央検査部 戸塚 実技師長、上野一郎副技師長、日高恵以子主任をはじめとする遺伝子検査室の方々、血液検査室 石川伸介主任、樋口由美子技官、ならびに中越りつこ技官（現長野県立こども病院）に厚くお礼を申し上げます。

長年にわたり、臨床化学の研究において様々のご指導を頂きました元信州大学医療技術短期大学部教授 野本昭三先生、遺伝子解析を初歩から教えて頂きました元信州大学医学部助教授 降旗謙一先生に心から感謝申し上げます。

さらに、大学院進学のお機会を認めて頂くと共に、在学中も多大な便宜を計って頂きました、信州大学医療技術短期大学部教授 田口八郎先生はじめ衛生技術学科の諸先生、および大学院在学中、常に励まし合い、協力しました同衛生技術学科助手 小穴こず枝先生、亀子文子先生に心よりお礼を申し上げます。

最期に、いつも精神的な支えとなってくれた家族に、心から感謝します。

關係論文

參考文獻

本研究に関する発表論文

1. Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Kiyoshi Kitano, Nobuaki Hayashida, Makoto Shimosaka, Mitsuo Okazaki, Susan T. Lord : Hypofibrinogenemia Associated With a Heterozygous Missense Mutation $\gamma 153\text{Cys to Arg}$ (Matsumoto IV): In Vitro Expression Demonstrates Defective Secretion of the Variant Fibrinogen. Blood Vol. 94 : 4122-4131, 1999
2. Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Yumiko Higuchi, Shinsuke Ishikawa, Minoru Tozuka, Fumihiro Ishida, Kiyoshi Kitano, Tsutomu Katsuyama : Fibrinogen Matsumoto III : a Variant with $\gamma 275\text{Arg}\rightarrow\text{Cys}$ (CGC \rightarrow TGC) — Comparison of Fibrin Polymerization Properties with those of Matsumoto I ($\gamma 364\text{Asp}\rightarrow\text{His}$) and Matsumoto II ($\gamma 308\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}$). Thrombosis and Haemostasis Vol. 81 : 763-766, 1999
3. Fumiko Terasawa, Kiyotaka Fujita, Minoru Tozuka, Hiroyoshi Ota, Tsutomu Katsuyama, Nobuo Okumura : Identification of a dysfibrinogen, the substitution of $\gamma 308\text{Asn(AAT)}$ to Lys(AAG) , using coagulation tests, immunoblot analysis, and allele-specific polymerase chain reaction. Clinica Chimica Acta, 2000 (In press)
4. 寺澤文子, 小穴こず枝, 亀子文子, 奥村伸生 : Thrombin-catalyzed fibrin polymerization試験によるフィブリノゲン機能解析—至適条件の検討と3例の異常フィブリノゲンの比較—信州大学医療技術短期大学部紀要 Vol.23:1-8, 1998
5. Nobuo Okumura, Kenichi Furihata, Fumiko Terasawa, Shinsuke Ishikawa, Ichiro Ueno, Tsutomu Katsuyama : Fibrinogen Matsumoto II : $\gamma^{308}\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}$ (AAT \rightarrow AAG) mutation associated with bleeding tendency. British Journal of Haematology Vol. 94 : 526-528, 1996
6. 寺澤文子, 佐々木由美子, 石川伸介, 中越りつこ, 降旗謙一, 勝山 努, 奥村伸生 : 2例のフィブリノゲン異常症における凝固スクリーニング検査結果の比較検討. 臨床病理 Vol. 44 : 791-796, 1996
7. 寺澤文子, 高宮 脩, 加藤亮二, 小穴こず枝, 亀子文子, 奥村伸生 : 異常フィブリノゲン解析のためのフィブリンモノマー重合試験の至適条件.

- 生物試料分析 Vol.19 : 180-187, 1996
8. Nobuo Okumura, Kenichi Furihata, Fumiko Terasawa, Ritsuko Nakagoshi, Ichiro Ueno, Tsutomu Katsuyama : Fibrinogen Matsumoto I : A γ 364Asp \rightarrow His (GAT \rightarrow CAT) Substitution Associated with Defective Fibrin Polymerization. *Thrombosis and Haemostasis* Vol. 75 : 887-891, 1996
 9. 奥村伸生, 寺澤文子, 降旗謙一 : 異常フィブリノゲン Matsumoto I・IIの構造異常と機能異常の解析. *信州医学雑誌* Vol. 44 : 317-327, 1996
 10. 寺澤文子, 奥村伸生, 降旗謙一 : フィブリノゲン γ 鎖における遺伝子多型の検討. *信州大学医療技術短期大学部紀要* Vol. 20 : 31-36, 1995

参考文献

1. Doolittle RF, Bouma IH, Cottrell BA, Strong D, Watt KWK: The covalent structure of human fibrinogen, in Bing DH (ed): *The chemistry and physiology of the proteins*. New York, NY, Pergamon Press, 77,1979
2. Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. *Sci Amer* 245:92,1981
3. 松田道生 : 血液凝固ー止血と血栓・下3. 凝固第三相 (A) , 線維素原. 福武勝博 編, 宇宙堂八木店 (東京) 1983
4. 松田道生 : 8. フィブリノゲン. 止血・血栓・線溶, 鈴木宏治 編, 東京, 中外医学社 : 342 , 1994
5. Cote HCF, Lord ST, Oratt KP: γ -chain dysfibrinogenemias:Molecular structure-function relationship of naturally occurring mutations in the γ chain of human fibrinogen. *Blood* 92:2195,1998
6. Martinez J: Quantitative and qualitative disorders of fibrinogen. *Hematology, Part VI. Hemostasis and thrombosis, Chapter 106. Quantitative disorders of fibrinogen.*1342,1991
7. Matsuda M: The structure-function relationship of hereditary dysfibrinogens. *Inter J Hematology* 64:167,1996
8. Koopman J, Haverkate F: Hereditary variants of human fibrinogens, in Bloom AL, Forbes

- CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): Haemostasis and Thrombosis, 3rd Edn. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, 515,1994
9. Ebert RF. Index of variant human fibrinogens 1994 Edition. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994
 10. Imperato C, Dettori A: Ipoibrinogenemia congenital con fibrinoastenia. *Helv Paed Acta* 13:380, 1958
 11. Chung DW, Harris JE, Davie EW: Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen, in Lie CY, Chien S (eds): Fibrinogen, thrombosis, coagulation and fibrinolysis. New York, NY, Plenum Press, 39,1990
 12. Matsuda M, Suga T, Yoshida N, Terukina S, Yamazumi K, Niwa K, Maekawa H: Structure and function of fibrinogen; Insights from dysfibrinogens. *Thromb Haemost.* 82:283,1999
 13. Robe F, Salomon E: Uber Faserstoffmangel in Blut bei einen Falle von Haemophilie. *Dtsch Arch Klin Med* 132:240,1920
 14. Mammen EF: Fibrinogen abnormalities. *Semin Thromb Hemost* 9:1,1983
 15. Risak E: Fibrinopenie. *A Klin Med* 128:605,1935
 16. Roberts HR, Eberst ME: Disorders of fibrinogen, in Loscalzo J, Schafer AI (eds): Thrombosis and Hemorrhage. Boston, MA, Blackwell Scientific Publications,701, 1994
 17. Neeman-Arbez M, Honsberger A, Antonarakis SE, Morris MA: Deletion of the alpha-chain gene(FGA) causes congenital afibrinogenemia. *J Invest* 103:215,1999
 18. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, Saito H, Sala N, Witt I, Cooper DN: Protein C deficiency: A data base of mutations, 1995 update. *Thromb Haemost* 73:876,1995
 19. Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V, Aillaud Mf, Dreyfus M, Matheron C, Gaussem P, Abgrall JF, Jude B, Sie P, Toulon P, Aiach M: Identification of 15 different candidate causal point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S deficiency using a scanning method for the analysis of the Protein S active gene. *Blood* 85:130,1995
 20. Lane DA, Olds RJ, Boisclair M, Chowdhury V, Thein SL, Cooper DN, Blajchman M, Perry D, Emmerich J, Aiach M: Antithrombin III mutation database: First update. *Thromb Haemost* 70:361,1993
 21. Tuddenham EGD, Pemberton S, Cooper DN: Inherited factor VII deficiency: Genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost* 74:313,1995

22. 奥村伸生, 横山知恵, 中越りつこ, 新井美和子, 勝山 努, 金井正光: ラテックス近赤外比濁法を利用したフィブリノゲン抗原量測定法の検討. 医学と薬学 25:111,1991
23. Okumura N, Kagiya H, Kumagai T, Kameko M, Tozuka M, Saito H, Katsuyama T, Kanai M: Analysis of cross-linked fibrin and fibrinogen degradation products with SDS-PAGE and immunoblot. Jap J Clin Pathol 38:201(in Japanese)
24. Binnie CG, Hettasch JM, Strickland E, Lord ST: Characterization of purified recombinant fibrinogen: Partial phosphorylation of fibrinopeptide A. Biochemistry 32:107,1993
25. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680,1970
26. Kehl M, Lottspeich F, Henschen A: Analysis of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem. 362:1661,1981
27. Takebe M, Soe G, Kohno I, Sugo T, Matsuda M: Calcium ion-dependent monoclonal antibody against human fibrinogen; preparation, characterization, and application to fibrinogen purification. Thromb Haemost 73:662,1995
28. Okumura N, Gorkun OV, Lord ST: Severely impaired polymerization of recombinant fibrinogen γ -364 Asp \rightarrow His, the substitution discovered in a heterozygous individual. J Biol Chem 272:29596,1997
29. Mihalyi E: Clotting bovin fibrinogen. Kinetic analysis of the release of fibrinopeptides by thrombin and of the calcium uptake upon clotting at high fibrinogen concentration. Biochemistry 27:976,1988
30. Weisel JW, Nagaswami C: Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations; clot structure and assembly are kinetically controlled. Biophys J 63:111,1992
31. Yamazumi K, Doolittle RF, Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: Localization of the label to γ -chain Tyr-363. Proc Natl Acad Sci USA 89:2893,1992
32. Hasegawa N, Sasaki S: Location of the binding site "b" for lateral polymerization of fibrin. Thromb Res 57: 183,1990
33. Cierniewski CS, Budzynski AZ: Involvement of the α chain in fibrin clot formation. Effect of monoclonal antibodies. Biochemistry 31:4248,1992
34. Gorkun OV, Veklich YI, Medved LV, Haenschen AH, Weisel JW: Role of the α C domains

- of fibrin in clot formation. *Biochemistry* 33:6986,1994
35. Pratt KP, Cote HCF, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW: The primary fibrin polymerization pocket: Three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal gchain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 389:455,1997
 36. Steinmann C, Reber P, Jungo M, Lammle B, Heinemann G, Wermuth B, Furlan M: Fibrinogen Bern I: Substitution γ 337Asn-Lys is responsible for defective fibrin monomer polymerization. *Blood* 82: 2104,1993
 37. Steinmann C, et al: A new substitution, γ 358 Ser-Cys, in fibrinogen polymerization. *Blood* 84:1874,1994
 38. Yoshida N, Hirata H, Morigami Y, Imaoka S, Matsuda M, Yamazumi K, Asakura S: Characterization of an abnormal fibrinogen Osaka V with the replacement of γ -arginine 375 by glycine. The lack of high affinity calcium binding to D-domains and the lack of protective effect of calcium on fibrinolysis. *J Biol Chem* 267:2753,1992
 39. Bentolila S, Samama MM, Conard J, Horellou MH, French P: Association of dysfibrinogenemia and thrombosis. Apropos of a family(fibrinogen Melun) and review of the literature(in French). *Annalen Med Interne* 145:575,1995
 40. Schmelzer CH, Ebert RF, Bell WR: Fibrinogen Baltimore IV: Congenital dysfibrinogenemia with a γ 275(Arg \rightarrow Cys)substitution. *Thromb Res* 56:307,1989
 41. Haverkate F, Samama M: Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost* 73:151,1995
 42. Mosesson MW, Siebenlist KR, Olson JD: Thrombophilia associated with dysfibrinogenemia (fibrinogen Cedar Rapids(R γ 275C)) and heterozygous factor V Leiden defect. *Thromb Haemost* OC-1560:382,1997
 43. Steinmann C, Bogli C, Jungo M, Lammle B, Heinemann G, Wermuth B, Redaelli R, Baudo F, Furlan M: Fibrinogen Milano V: A congenital dysfibrinogenemia with a γ 275 Arg-Cys substitution. *Blood Coagul Fibrinol* 15:463,1994
 44. Furlan M, Stucki B, Steinmann C, Jungo M, Lammle B: Normal binding of calcium to five fibrinogen variants with mutations in the carboxy terminal part of the γ -chain. *Thromb Haemost* 76:377,1996
 45. Terukina S, Matsuda M, Hirata H, Takeda Y, Miyata T, Takao T, Shimonishi Y: Substitution of γ -Arg275 by Cys in an abnormal fibrinogen, "fibrinogen Osaka II." Evidence

- for a unique solitary cysteine structure at the mutation site. *J Biol Chem* 263:13576,1988
46. Terukina S, Matsuda M, Yoshida N, Yamazumi K, Takeda Y, Takano T: Two abnormal fibrinogens designated as Osaka II and Morioka with a hitherto unidentified amino acid substitution; γ -Arg-275 by Cys(abstr). *Thromb Haemost* 58:515,1987
 47. Yoshida N, Ota K, Moroi M, Matsuda M: An apparently higher molecular weight γ -chain variant in a new congenital abnormal fibrinogen Tochigi characterized by the replacement of γ arginine-275 by cysteine. *Blood* 71:480,1988
 48. Matsuda M, Baba M, Morimoto K, Nakamikawa C: "Fibrinogen Tokyo II". An abnormal fibrinogen with an impaired polymerization site on the aligned DD domain of fibrin molecules. *J Clin Invest* 72:1034, 1983
 49. Borrel M, Garcia A, Fontcuberta J: Abnormal polymerization and normal binding of plasminogen and t-PA in three new dysfibrinogenaemias: Barcelona III and IV(γ Arg275-His) and Villajoyosa(γ Arg275-Cys). *Blood Coagul Fibrinol* 6:198,1995
 50. Reber P, Fulan M, Henschen A, Kaudewitz H, Barbui T, Hilgard P, Nenci GG, Berrettini M, Beck EA: Three abnormal fibrinogen variants with the same acid substitution γ 275Arg-His): Fibrinogen Bergama II, Essen and Perugia. *Thromb Haemost* 56:401,1986
 51. Steinmann C, Jungo M, Beck EA, Lammle B, Furlan M: Fibrinogen Claro-Another dysfunction fibrinogen variant with γ 275 arginine-histidine substitution (published erratum appears in *Thromb Res* 82:107,1996). *Thromb Res* 81:145,1996
 52. Siebenlist KR, Mosesson MW, DiOrio JP, Tavori S, Tatarsky I, Timon A: The polymerization of fibrin prepared from fibrinogen Haifa(γ 275Arg \rightarrow His). *Thromb Haemost* 62:875,1989
 53. Yamazumi K, Terukina S, Onohara S, Matsuda M: Normal plasmic cleavage of the γ -chain variant of "fibrinogen Saga" with an Arg-275 to His substitution. *Thromb Haemost* 60:476,1988
 54. Yoshida N, Imaoka S, Hirata H, Matsuda M, Asakura S: Heterozygous abnormal fibrinogen Osaka III with the replacement of γ arginine-275 by histidine has an apparently higher molecular weight γ -chain variant. *Thromb Haemost* 68:534,1992
 55. Furlan M, Stucki B, Steinmann C, Jungo M, Lammle B: Normal binding of calcium to five fibrinogen variants with mutation in the carboxy terminal part of the γ -chain. *Thromb*

Haemost 76:377,1996

56. Mimuro J, Kawata Y, Niwa K, Muramatsu S, Madoiwa S, Hirata H, Takano H, Sugo T, Sakata Y, Sugimoto K, Nose K, Matsuda M: A new type of Ser substitution for γ Arg-275 in fibrinogen Kamogawa I characterized by impaired fibrin assembly. *Thromb Haemost* 81:940-, 1999
57. Mosesson MW, Siebenlist KR, DiOlio JP, Matsuda M, Hainfeld JF, Wall JS: The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen TokyoII (γ 275Arg \rightarrow Cys). *J Clin Invest.*96 : 1053, 1995
58. Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF: Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 389:455,1997
59. Niwa K, Takebe M, Sugo T, Kawata Y, Mimuro J, Asakura S, Sakata Y, Mizushima J, Maeda A, Endo H, Matsuda M: A γ Gly-268 to Glu substitution is responsible for impaired fibrin assembly in a homozygous dysfibrinogen Kurashiki I. *Blood* 87:4686,1996
60. Bantia S, Mane SM, Bell WR, Dang CV: Fibrinogen Baltimore I: Polymerization defect associated with a γ 292Gly-Val(GGC-GTC) mutation. *Blood* 76:2279,1990
61. Niwa K: Studies on the mechanism of fibrin fiber formation-comparison among three hereditary dysfibrinogens with a γ 275Arg to Ser, His, or Cys mutation-. *Jap J Thromb Hemost* 8:33,1997(in Japanese).
62. Mimuro J, Muramatsu S, Maekawa H, Sakata Y, Kaneko M, Yoshitake S, Okuma M, Ito Y, Takeda Y, Matsuda M: Gene analysis of abnormal fibrinogens with a mutation in the γ chain. *Int J Hematol* 56:129,1992
63. Grailhe P, Boyer-Neumann C, Haverkate F, Grimbergen J, Laarrieu MJ, Angles-CanoE: The mutation in fibrinogen Bicetre II(Asn308-Lys) does not affect the binding of t-PA and plasminogen to fibrin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 4:679,1993
64. Bantia S, Bell WR, Dang CV: Polymerization defect of fibrinogen Baltimore III Due to a γ Asn308-Ile mutation. *Blood* 75:1659,1990
65. Miyata T, Furukawa K, Iwanaga S, Takamatsu J, Saitoh: Fibrinogen Nagoya, a replacement of γ glutamine-329 by arginine in the chain that impairs the polymerization of fibrin monomer. *J Biochem* 105:10,1989
66. De Jong WW, Zweers A, Cohen LH: Influence of single amino acid substitutions on electrophoretic mobility of sodium dodecyl sulfate-protein complexes. *Biochem Biophys*

Res Commun 88:532,1978

67. Noel D, Nikaido K, Ames GFL: A single amino acid substitution in a histidine-transport protein drastically alters its mobility in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 18: 4159,1979
68. Dang CV, Ebert RF, Bell WB: Localization of a fibrinogen calcium binding site between subunit positions 311 and 336 by terbium fluorescence. *J Biol Chem* 260:9713,1985
69. Yee VC, Pratt KP, Cote HCF, Trong IL, Chung DW, Davie EW, Stenkamp RE, Teller DC: Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the γ chain of human fibrinogen. *Structure* 5:125,1997
70. Koopman J, Haverkate F, Briet E, Lord ST: A congenitally abnormal fibrinogen(Vlissingen) with a 6-base deletion in the γ -chain gene, causing defective calcium binding and impaired fibrin polymerization. *J Biol Chem* 266:13456,1991
71. Yamazumi K, Shimura K, Terukina S, Takahashi N, Matsuda M: A γ Methionine-310 to threonine substitution and consequent N-glycosylation at γ asparagine-308 identified in a congenital dysfibrinogenemia associated with posttraumatic bleeding, fibrinogen Asahi. *J Clin Invest* 83:1590,1989
72. Rooney MM, Parise LV, Lord ST: Dissecting clot retraction and platelet aggregation. Clot retraction does not require an intact fibrinogen γ chain C terminus. *J Biol Chem* 271:8553,1996
73. Doolittle RF: A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives. *Protein Sci* 1:1563,1992
74. Shainoff JR, Dardik BN: Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism; physiologic significance in delayed release of the peptide. *Ann NY Acad Sci* 408:254,1983
75. Okada M, Blomback B: Calcium and fibrin gel structure. *Thromb Res* 29:269,1983
76. Carr ME, Gabriel DA, McDonagh J: Influence of Ca^{2+} on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. *Biochem J* 239:513,1986
77. Okumura N, Gorkun OV, Lord ST: Severely impaired polymerization of recombinant fibrinogen γ -364Asp-His, the substitution discovered in a heterozygous individual. *J Biol Chem* 272:29596,1997
78. Baumann RE, Henschen AH: Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriction endonuclease digestion and allele-specific polymerase chain reaction amplification:

- Identification of polymorphism at positions A α 312 and B β 448. *Blood* 82:2117,1993
79. Sugahara Y, Miura O, Hirosawa S, Aoki N: Compound heterozygous Protein C deficiency caused by two mutations, Arg-178 to Gln and Cys-331 to Arg, leading to impaired secretion of mutant Protein C. *Thromb Haemost* 72:814,1994
80. Yamamoto K, Tanimoto M, Emi N, Matsushita T, Takamatsu J, Saito H: Impaired secretion of the elongated mutant of Protein C (Protein C-Nagoya) Molecular and cellular basis for hereditary Protein C deficiency. *J Clin Invest* 90:2439,1992
81. Koopman J, Haverkate F, Grimbergen J, Egbring R, Lord ST: Fibrinogen Marburg: A homozygous case of dysfibrinogenemia, lacking amino acids A α 461-610 (Lys 461 AAA \rightarrow Stop TAA). *Blood* 80:1972,1992
82. Ridgway HJ, Brennan SO, Faed JM, George PM: Fibrinogen Otago: a major α chain truncation associated with severe hypofibrinogenaemia and recurrent miscarriage. *Br J Haematol* 98:632,1997
83. Furlan M, Steinmann C, Jungo M, Bogli C, Baudo F, Redaelli R, Fedeli F, Lammle B: A frameshift mutation in exon V of the A α -chain gene leading to truncated A α -chains in the homozygous dysfibrinogen Milano III. *J Biol Chem* 269:33129,1994
84. Ridgway HJ, Brennan SO, Gibbons S, George PM: Fibrinogen Lincoln: a new truncated α chain variant with delayed clotting. *Br J Haematol* 93:177,1996
85. Uemichi T, Liepnieks JJ, Yamada T, Gertz MA, Bang N, Benson MD: A frame shift mutation in the fibrinogen A α chain gene in a kindred with renal amyloidosis. *Blood* 87:4197,1996
86. Asl LH, Liepnieks JJ, Uemichi T, Rebibou J-M, Justrabo E, Droz D, Mousson C, Chalopin J-M, Benson MD, Delpech M, Grateau G: Renal amyloidosis with a frame shift mutation in fibrinogen A α -chain gene producing a novel amyloid protein. *Blood*
87. Liu CY, Koehn JA, Morgan FJ: Characterization of fibrinogen New York 1 A dysfunctional fibrinogen with a deletion of B β (9-72) corresponding exactly to exon 2 of the gene. *J Biol Chem* 260:4390,1985
88. Gorkun OV, Henschen-Edman AH, Ping LF, Lord ST: Analysis of A α 251 fibrinogen: The α C domain has role in polymerization, albeit more subtle than anticipated from the analogous proteolytic fragment X. *Biochemistry* 37:15434,1998

89. Sawai N, Koike K, Mwamtemi HH, Kinoshita T, Kurokawa Y, Sakashita K, Higuchi T, Takeuchi K, Shiohara M, Kamijo T, Ito S, Kato T, Miyazaki H, Yamashita T, Komiyama A: Thrombopoietin augments stem cell factor-dependent growth of human mast cells from bone marrow multipotential hematopoietic progenitors. *Blood* 93:3703,1999
90. Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimaru K, Asano S, Fujita T, Nakahata T, Motokura T: Expression of p21Cip1/Waf1/Sdi1 and p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 93: 4167,1999
91. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM: Intracellular assembly of human fibrinogen. *J Biol Chem* 258:13407,1983
92. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM: Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. *J Biol Chem* 259:10574,1984
93. Huang S, Mulvihill ER, Farrell DH, Chung DW, Davie EW: Biosynthesis of human fibrinogen. *J Biol Chem* 268:8919,1993