

原 著

フィブリン重合反応における D-E ('a-A') 結合異常の解析

—Dドメイン('a')に変異を有する Matsumoto I(γ 364 Asp→His)と
Eドメイン('A')に変異を有する Matsumoto V(A α 19 Arg→Gly)の比較—

寺澤文子¹⁾, 田中 仁²⁾, 廣田(川戸洞)雅子³⁾, 石川伸介³⁾, 奥村伸生¹⁾

Functional analyses for D-E binding of fibrin polymerization

—Functional comparison between Matsumoto I (γ 364 Asp→His) having impaired
D domain ('a' site) and Matsumoto V (A α 19 Arg→Gly) having impaired
E domain ('A' site) —

Fibrinogen Matsumoto I (M·I) and V (M·V) are dysfibrinogens which are heterozygous (Asp or His) at γ 364 and heterozygous (Arg or Gly) at A α 19, respectively. γ 364 and A α 19 have been demonstrated to be the most important residue in the so-called 'a' site in the D domain and the 'A' site in the E domain, respectively. Although the thrombin-catalyzed release of fibrinopeptide A from M·I and M·V was almost the same as that from normal controls, their thrombin-catalyzed fibrin polymerization (TCFP) was markedly impaired as compared with normal fibrinogen. Furthermore, their reptilase-catalyzed fibrin polymerization (RCFP) was much more impaired than their TCFP. In particular, no significant RCFP was observed in the case of M·I. Taken together our observations suggest that, when the 'A' site is impaired in TCFP, 'a-B' binding of M·V may play a more important role, and when the 'a' site is impaired, 'b-A' and/or 'b-B' interaction may not compensate for the polymerization of M·I.

Key words :

Variant fibrinogen (変異フィブリンゲン), 'A' polymerization site ('A' 重合反応基),
'a' polymerization site ('a' 重合反応基), D-E binding (D-E 結合)

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; TERASAWA Fumiko, OKUMURA Nobuo, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医学部第二内科学教室; TANAKA Hitoshi, Second Dept. of Internal Medicine, Shinshu Univ. School of Medicine

3) 信州大学医学部附属病院中央検査部; HIROTA-KAWADOBORA Masako, ISHIKAWA Shinsuke, Central Clinical Laboratory, Shinshu Univ. Hospital

はじめに

フィブリノゲン (Fibrinogen, Fbg) 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。Fbgは、 $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, γ 鎖と呼ばれる3種類のポリペプチドがアミノ末端 (N末端) 側でS-S結合により2量体を形成しており、 $(\text{A}\alpha\text{-B}\beta\text{-}\gamma)_2$ と表わされる。2つのカルボキシル末端 (C末端) 側は互いに反対側に離れて存在しており、中央のN末端側をEドメイン、両側のC末端側をDドメインと呼んでいる^{1,2)}。Fbgは血液凝固の最終段階で第II因子であるプロトロンビンが活性化されたトロンビンの作用により、まずEドメインの中にある $\text{A}\alpha$ 鎖N末端から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、そこに重合反応基 'A' が露呈する。続いて $\text{B}\beta$ 鎖N末端から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、同様に重合反応基 'B' が露呈し、 $(\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma)_2$ のフィブリンモノマーとなる。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プロトフィブリルを形成するが、このとき 'A' がDドメインの中にある γ 鎖C末端側に存在する 'a' と呼ばれる反応基と、'B' が β 鎖C末端側に存在する 'b' と呼ばれる反応基とそれぞれ 'a-A', 'b-B' という形でD-E結合することにより、フィブリンの重合が開始する³⁻⁷⁾ (Fig. 1)。我々は、このようなフィブリンの重合に重要な機能を持つ 'A' 反応基と 'a' 反応基にそれぞれ変異を有する2例のFbg異常症に遭遇したことから、これらの機能検査を行なって比較し、構造異常を有する反応基の場合のフィブリン重合様式について検討した。

材料と方法

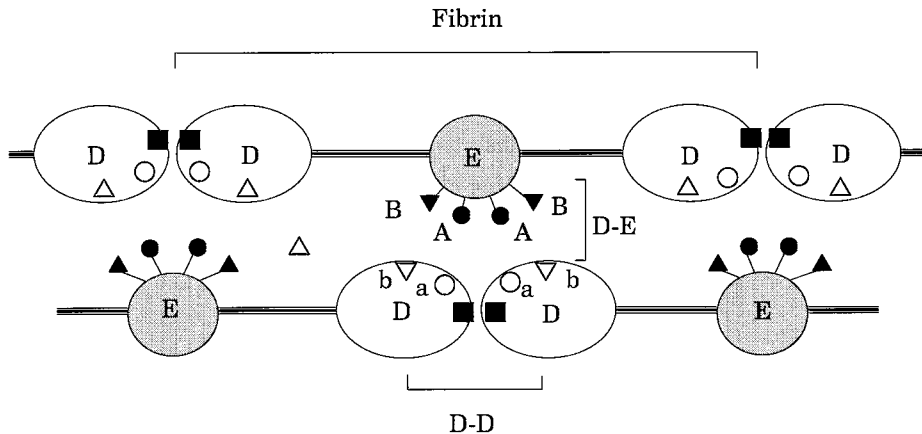


Fig. 1. Schematic model of D-E interactions between adjacent fibrin monomers at the beginning of the thrombin-catalyzed fibrin polymerization. Thrombin cleaves the each N-terminus of $\text{A}\alpha$ and $\text{B}\beta$ chains, creating a new N terminus, the A site (●) and the B site (▲), beginning with the sequence Gly-Pro-Arg and Gly-His-Arg, respectively. The A site binds to the complementary 'a' polymerization pocket in the γ chain (○) and the B site binds to the complementary 'b' in the β chain (△) during the alignment of the fibrin protofibrils. D-E interaction generates two stranded protofibrils in which individual monomers are half-staggered with their D regions aligned in an end-to-end manner with D-D interaction site (■)

1. 症例

1 例目の Fibrinogen Matsumoto I (以下 M・I) の発端者は 1 才の男児で、先天性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、Fbg の著しい低値を認めた。2 例目の Fibrinogen Matsumoto V (以下 M・V) の発端者は 52 才の女性で、全身性エリテマトーデスの加療中に Fbg 濃度の異常を指摘された。2 例ともに出血傾向、血栓などの臨床症状はみられなかった。それぞれインフォームドコンセントを得た上で、末梢血から血漿および DNA を分離した。

2. 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である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), Fbg の定量を行なった。Fbg はトロンビン時間法を用いて機能的に定量する方法と、抗ヒト Fbg 抗体感作ラテックス粒子を用いて Fbg タンパク量を抗原量として定量する免疫法との二法により測定した。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。

3. フィブリノゲンの遺伝子解析

末梢血から SepaGene (三光純薬) を用いて DNA を抽出し、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。抽出した DNA は 100 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。

PCR は、A α 鎖に 4 組、B β 鎖に 5 組、 γ 鎖に 6 組の計 30 本のプライマーを用いて行なった⁸⁾。DNA 塩基配列はさらに A α 鎖のエクソン V の塩基配列解析用に追加した 2 本を含め計 32 本のプライマーを用いて Dye Deoxy Terminator 法 (Applied Biosystems Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) により、Prism 310 DNA Sequencer (ABI 社) で解析した⁹⁾。

4. フィブリノゲンの機能検査

1) フィブリノゲンの精製

Fbg の精製は、IF-1 モノクローナル抗体 (抗 Fbg 抗体, ヤトロン) を結合させた CNBr 活性化 Sepharose 4 B 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¹⁰⁾。1 mM のカルシウムイオン存在下でカラムに吸着した Fbg を、5 mM EDTA を含む溶液で溶出した。ただし、M・I の精製においては、10 mM Ca イオン存在下で吸着した Fbg 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 1 mM 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 Fbg は CaCl₂ を含まない上記緩衝液に対して透析した。Fbg 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、Fbg 1.0 mg/mL に相当する¹¹⁾。得られた Fbg は SDS-PAGE で純度および分解のないこと、プラスミノゲン、第 XIII 因子、フィブロンекチンを含まないことを確認した後、使用するまで -80°C で保存した。

2) 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¹²⁾

精製した正常と M・V の Fbg の 0.22 mg/mL 225 μ L に, 0.2 NIH U/mL ヒト α -トロンビン (Sigma) を 25 μ L ずつ添加し, 37°C でそれぞれ 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 120 分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 3 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 rpm 10 分間遠心した。沈殿中のフィブリン網と未反応の Fbg 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-5 A) により分離した。また, FPA のみを特異的に切断し放出させるレプチラーゼ (蛇毒, Pentapharm Ltd) 0.2 U/mL を 25 μ L ずつ添加した場合についても同様に実施した。

カラムは, 逆相クロマトグラフィー用の COSMOSIL 5 C 18 P (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 20-32% 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-3 A 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 Fbg を 50 倍濃度のトロンビン, または 10 倍濃度のレプチラーゼと 3 時間反応させたものの放出量を 100% とし, % 放出量で表現した。

3) Thrombin- or reptilase- catalyzed fibrin polymerization (T- or R-CFP) 試験¹³⁾

T- or R-CFP 試験は 350 nm における吸光

度の経時的变化として, Shimadzu UV-110-02 により測定した。0.12 M NaCl, 1.0 mM CaCl₂ 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 Fbg 溶液 90 μ L に, TCFP 試験には 0.5 U/mL のヒト α -トロンビン 10 μ L, RCFP 試験には 0.5 U/mL レプチラーゼ 10 μ L を加えてよく混和し, 直ちに吸光度の経時的变化を記録した。終濃度は Fbg 0.18 mg/mL, トロンビン 0.05 U/mL であった。これらの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) によりプロトフィブリル形成過程を, 最大重合速度 (Vmax, 重合反応曲線の最大吸光度変化率) によりプロトフィブリル凝集過程を評価した。

4) フィブリン凝集率 (Fibrin clottability)¹³⁾ およびフィブリンモノマー重合試験 (Fibrin monomer polymerization)¹⁴⁾

フィブリン凝集率は, 0.12 M NaCl と 1.0 mM CaCl₂ を含む 20 mM HEPES, pH 7.4 により 0.45 mg/mL となるように希釈した Fbg に終濃度 0.25 U/mL のヒト α -トロンビンを加えてよく混和し 3 時間静置した後, 4°C で 1 晩放置し, 完全にゲル化させた。フィブリン塊を除去した残液を 1,500 rpm, 15 分間遠心した後, 上清を 280 nm で吸光度を測定し, フィブリン塊の形成に使われた Fbg の量の比を求めた。計算式は (A 280 0 time - A 280 上清) \div (A 280 0 time) \times 100 である。

フィブリンモノマー重合試験は, フィブリン凝集率試験により重合したフィブリン塊を用いて実施した。フィブリン塊は 0.12 M NaCl を含む 20 mM HEPES, pH 7.4 でよく洗浄し, ろ紙上で乾燥した後, 0.02 M 酢酸溶液に溶解した。その 10 μ L (0.01 mg) を 10 倍量の 0.12 M NaCl を含む 20 mM HEPES, pH 7.4 に再び戻すと白濁する。その過

Table 1. Coagulation screening tests and genetic analysis results in Matsumoto I and Matsumoto V

	Matsumoto I	Matsumoto V	reference range
PT (sec)	13.0	11.0	10.0-12.0
APTT (sec)	29.4	28.6	24.0-37.0
Fibrinogen (g/L)			
Thrombin time method	0.16	0.92	2.0-4.0
Immunologic method	3.40	4.71	2.0-4.0
TT/IM×100 (%)	4.7	19.5	100
Fibrinogen chain	γ364	Αα19	
Wild type amino acid	Asp (GAT)	Arg (AGG)	
Patient amino acid allele	His (CAT) hetero	Gly (GGG) hetero	

程を350 nmで経時的に観察し、重合開始までの時間(lag time)と、最大重合速度(Vmax, 重合反応曲線の最大吸光度変化率)により評価した。

結果

1. 凝固スクリーニング検査結果

M・Iの結果は、PT 13.0秒(基準範囲10.0-12.0秒)、APTT 29.4秒(基準範囲24.0-37.0秒)、Fbg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(基準範囲2.0-4.0 g/L)であった。トロンビン時間法と免疫法によるFbg量の濃度比(以下Fbg濃度比)は4.7%であった。

M・Vの結果は、PT 11.0秒、APTT 28.6秒、Fbg量はトロンビン時間法で0.92 g/L、免疫法で4.71 g/L、Fbg濃度比は19.5%であった(Table 1)。

2. DNA塩基配列解析

M・I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。このG→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のアスパラギン酸と、CATでコードされるヒスチジンとのヘテロ接合体となることが明らかとなった¹⁵⁾。一方、M・VのΑα鎖エクソンIIにある第1211番ヌクレオチドに、アデニン(A)とグアニン(G)の2つの塩基のピークが認められた。このA→G置換により、Αα鎖19番アミノ酸は、AGGでコードされるwild typeのアルギニンと、GGGでコードされるグリシンとのヘテロ接合体となることが明らかとなった⁹⁾(Table 1)。

3. フィブリンペプチドAおよびフィブリンペプチドBの放出能

トロンビンによるFPA, FPBの放出能では、FPAの場合は正常に比べてM・Vにはほとんど差はなかったものの(Fig. 2 A), FPBの場合には明らかな低下が認められた(Fig. 2 B)。一方、レプチラーゼによるFPAの放出能には、M・Vと正常では違いは認められなかった(Fig. 2 C)。M・Iでは正常なFbgの場合と比較して、FPA, FPBともに差は認められなかった¹⁵⁾。

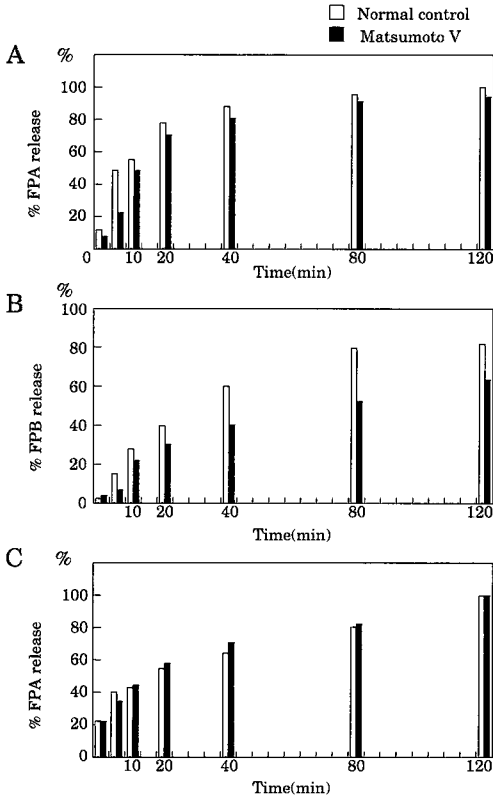


Fig. 2. Release of FPA (panel A) and FPB (panel B) induced by thrombin or the release of FPA (panel C) induced from purified normal and Matsumoto V fibrinogen as determined by HPLC. The percent release was calculated regarding the amount of FPA and FPB release at 3 h of incubation with 50-fold concentration of thrombin or 10-fold concentration of reptilase at 37°C as 100%

4. Thrombin- or reptilase- catalyzed fibrin polymerization (T- or R- CFP) 試験

TCFP 試験では, M・I では lag time の平均は, 3.8 ± 0.4 分, 重合速度は $7.7 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ 秒, 同様に M・V では 3.0 ± 0.2 分, $68.5 \pm 3.7 \times 10^{-5}$ 秒, 正常な場合は 1.4 ± 0.1 分, $151.5 \pm 1.5 \times 10^{-5}$ 秒であった. M・I, M・V と正常と比較して lag time の延長と重合速度の低下が認められたが, その程度は M・I のほうが大きかった. 一方, RCFP 試験の

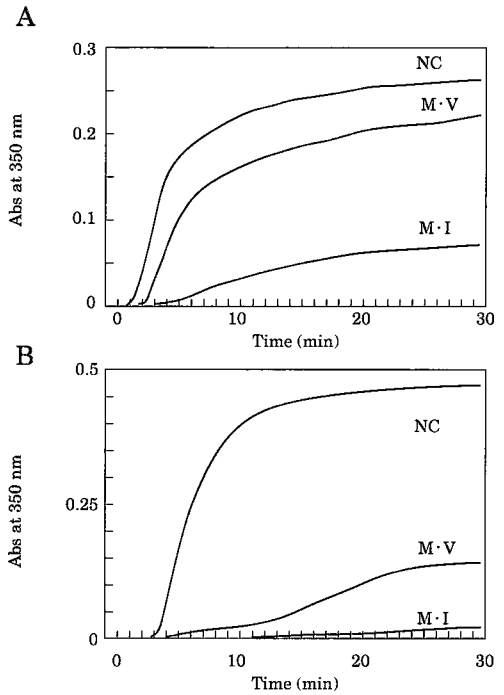


Fig. 3. Thrombin- or reptilase-catalyzed fibrin polymerization. Thrombin (0.05 units/mL ; panel A) or reptilase (0.05 units/mL ; Panel B) was added at 0 min to fibrinogen at 0.18 mg/mL in the presence of 1 mM CaCl₂. The change in turbidity with time was followed at 350 nm. Representative polymerization curve in triplicate experiments was shown with normal plasma fibrinogen (NC) and two variant fibrinogens, Matsumoto I (M・I) and Matsumoto V (M・V)

場合には M・V では lag time の平均は 10.2 ± 0.1 分, 最大重合速度は $17.0 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ 秒, 正常では同様に 3.7 ± 0.1 分, $158.7 \pm 0.8 \times 10^{-5}$ 秒であり, M・V ではトロンビンの場合に比べて大きく低下した. さらに, M・I では 8.9 ± 0.4 分, 最大重合速度は $1.7 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ 秒と著しい低下を示し, 重合反応はほとんど認められなかった (Fig. 3).

5. フィブリン凝集率 (Fibrin clottability) およびフィブリンモノマー重合試験 (Fibrin monomer polymerization)

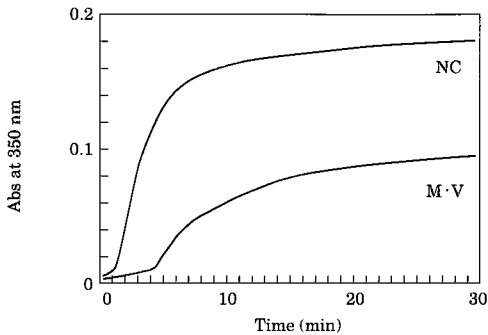


Fig. 4. Fibrin monomer (0.01 mg) generated by thrombin in 10 μ L of 0.02 M acetic acid was mixed with 90 μ L of 20 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.12 M NaCl. The changes in turbidity were monitored at 350 nm. Representative polymerization curve in triplicate experiments was shown with normal plasma fibrinogen (NC) and Matsumoto V (M·V)

フィブリン塊の形成に使われた Fbg の量を比較したフィブリン凝集率の結果では、正常対照は100%であったが、M·I は86.6%、M·V は92.4%と正常に比べ若干少なかった。またこの凝集物を酢酸酸性溶液に溶かし、中性に戻すと再び重合していく過程を観察したフィブリンモノマー重合試験の結果では、M·V の lag time の平均は 4.3 ± 0.1 分、最大重合速度は $24.2 \pm 2.2 \times 10^{-5}$ 秒となり、TCFP と比較して lag time はより延長し、重合速度はさらに低下していた。しかし M·I のフィブリン塊は非常に脆弱であり、トロンビン除去のための洗浄過程で失われてしまったために回収が困難となり、実施できなかった (Fig. 4)。

考 察

Fbg がトロンビンの作用によりフィブリンとなり重合していく過程については1950年代より研究されてきた。Fbg の構造のうち中央のN末端側をEドメイン、両側のC末端側をDドメインと呼んでいるが、Fbg 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 A α 鎖16番目と17番目のアミノ酸の間が加水分解されて、アミノ酸16個からなる FPA が放出されEドメインにグリシン-プロリン-アルギニン (Gly-Pro-Arg) からなる反応基 'A' が露呈される。続いて B β 鎖から同様にアミノ酸14個からなる FPB が放出されると、グリシン-ヒスチジン-アルギニン (Gly-His-Arg) からなる反応基 'B' が露呈される。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ドメイン中の γ 鎖の 'a' と、 β 鎖の 'b' と呼ばれる相補的結合部位と 'a-A', 'b-B' の形で結合し、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ドメイン同志が D-D 結合し、フィブリンモノマーは2本鎖らせん状のプロトフィブリルとなる (Fig. 1)。やがてこのようなプロトフィブリルが一定の長さに達すると、互いにまとまって束を形成し (lateral aggregation), さらに分岐してフィブリン網を形成しゲル化する³⁻⁷⁾。このフィブリン網は活性型第XIII因子のトランスグルタミナーゼ作用による γ 鎖- γ 鎖間、あるいは α 鎖- α 鎖間の共有結合 (架橋) を介して安定化フィブリンとなる。

今回われわれは、このような複雑なフィブリン重合機序の初期段階である D-E 結合の中心である 'A' と 'a' 反応基に変異を有する2種の変異フィブリノゲンを得たことから、それらの機能検査を行なって比較し、D-E 重合障害の程度や差異について検討した。M·V は 'A' 反応基である Gly-Pro-Arg のうちのアルギニンの変異であり、この残基は 'a' 反応基の γ 329グルタミン、 γ 330アスパラギン酸と結合することが明らかにされた¹⁶⁻¹⁹⁾。また M·I は 'a' 反応基の中心的

役割を果たしている γ 364アスパラギン酸の変異であり、この残基は 'A' 反応基の α 17グリシンと結合することが明らかにされている¹⁶⁻¹⁹⁾。

M·Vの変異箇所である A α 19は、トロンビンの作用により切断される部位のすぐ近くに位置している。そのため、この変異がFPAの放出に影響するかどうかを検討したところ、トロンビンあるいはレプチラーゼを用いた場合ともに正常との差は認められなかった。一方、FPAとFPBを放出し生成するM·Vのフィブリンモノマーの重合過程を観察するとTCFP試験に比較して著しい低下を示した。これらの結果からM·Vの重合機能低下の原因はFPAの放出の遅れによるものではなく、'a-A'結合の障害によることが明らかであった。さらにM·VにおいてトロンビンによるFPB放出能の低下が認められた。FPBの放出はFPAが放出されることによって開始される重合反応に伴って起こると考えられている²⁰⁾。このため 'a-A'の反応が速やかに進まないM·Vでは、FPBの放出が遅れたものと考えられる。

TCFP試験とRCFP試験の結果を比較すると、レプチラーゼを用いて 'A'のみを露呈させる(すなわち 'B'を欠いた)場合の方が、トロンビンを用いて 'A', 'B'ともに露呈させた場合よりもM·I, M·Vともに著しい機能低下が認められた。正常Fbgでもlag timeは2.6倍に延長したが、M·Vではlag timeが3.4倍、重合度は1/4となり、さらにM·Iでは重合反応はほとんど認められなかった。

WeiselとNagaswamiはフィブリン重合反応のシュミレーションに基づき、プロトフィブリル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²⁰⁾。したがって 'A'または '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も順調に進まないことが考えられる。しかし、同じD-E結合の障害であるのにもかかわらず、機能異常の程度は 'A'の変異によるM·Vよりも、'a'の変異によるM·Iのほうが極めて大きいことは明らかであった。このことから、我々は 'A'反応基が異常の場合には 'a-A'結合の障害により重合が順調にすすまないために、その代償として 'a-B'結合が生ずることを推測した。この現象については、すでにGly-His-Arg-Proを用いたX線解析により 'a-B'結合を証明した報告²¹⁾、あるいは 'B'反応基だけを露呈させたフィブリンが 'a'反応基と反応して重合することを観察した報告²²⁾からも、裏づけられる。しかし、これらの研究においても 'b-A'の結合の関与は確認されていないことから、M·Iのように 'a'反応基に異常があるために 'a-A'結合が障害された場合には 'b-A'結合による補償はなく、また 'a-B'結合が生じたとしても 'a'の異常のために極めて弱い結合しかできないものと推察される。したがって、このような場合にはD-E結合は主として 'b-B'結合に依存することになる。この結果M·Iの方がM·Vよりも極めて著しい重合異常を呈することになり、脆弱なフィブリン塊しか形成できないものと思われた (Table 2)。

以上の結果から、'A'反応基に異常を有する場合には 'B'反応基が代償的に機能するものの、'a'反応基はD-E結合にとって必須な重要構造を有していることが強く示唆された。

Table 2. Fibrin polymerization and its established and presumed binding site of Matsumoto I and V

polymerization	intensity of fibrin polymerization and D-E binding					
	M·I(T) (+)	M·I(R) (±)	M·V(T) 2(+)	M·V(R) (+)	N(T) 3(+)	N(R) 3(+)
established D-E binding						
'a-A'	▲	▲	▲	▲	●	●
'b-B'	●	-	●	-	●	-
presumed D-E binding						
'a-B'	▲	-	●	-	(●)	-
'b-A'	x	x	x	x	x	x

(T); thrombin-(R); reptilase- catalyzed fibrin polymerization

● ; normal (●) ; normal structure but not functioned
 ▲ ; affected ▲ ; remarkably affected
 x ; not detected - ; not examined

結 語

フィブリン重合反応のうち、D-E 結合に異常をもたらす 'A' と 'a' の反応基にそれぞれ異常を有する 2 例の変異フィブリノゲンの機能解析を行なって比較した。その結果、'a-A' 結合の 'A' 反応基が障害された場合には 'a-B' 結合が代償的におこって重合反応を補うものの、'a' 反応基が障害された場合には 'b-A' 結合による代償がおこらないものと考えられた。したがって、'a' 反応基はフィブリン重合反応における D-E 結合にとって必須の重要構造を有していることが示唆された。

文 献

- 1) Doolittle RF, et al.: 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) 松田道生: 血液凝固—止血と血栓・下血。凝固第三相(A), 線維素原, 福武勝博 編, 宇宙堂八木書店 (東京) 1983.
- 3) Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin polymerization: appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. Blood Coagulation Fibrinol, 8: 257-267.
- 4) Yamazumi K, et al.: 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.
- 5) Hasegawa N, et al.: Location of the binding site "b" for lateral polymerization of fibrin. Thromb Res, 57: 183, 1990.
- 6) Cierniewski CS, et al.: Involvement of the a chain in fibrin clot formation. Effect of monoclonal antibodies. Biochemistry, 31: 4248, 1992.
- 7) Gorkun OV, et al.: Role of the α C domains of fibrin in clot formation. Biochemistry, 33: 6986, 1994.
- 8) Terasawa F, et al.: Hypofibrinogenemia associated with a heterozygous missense mutation γ 153 Cys to Arg (Matsumoto IV): In vitro expression demon-

- strates defective secretion of the variant fibrinogen. *Blood*, 94 : 4122-4131, 1999.
- 9) Tanaka H, et al. : Fibrinogen Matsumoto V : a Variant with A α 19 Arg→Gly (AGG→GGG). *Thromb Haemost*, 85 : 108-113, 2001.
 - 10) Takebe M, et al. : Calcium ion-dependent monoclonal antibody against human fibrinogen ; preparation, characterization, and application to fibrinogen purification. *Thromb Haemost*, 73 : 662, 1995.
 - 11) 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.
 - 12) Kehl M, et al. : Analysis of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.*, 362 : 1661, 1981.
 - 13) Okumura N, et al. : Severely impaired polymerization of recombinant fibrinogen γ 364 Asp→His, the substitution discovered in a heterozygous individual. *J Biol Chem*, 272 : 29596, 1997.
 - 14) 寺澤文子, 他 : Thrombin-catalyzed fibrin polymerization 試験によるフィブリン機能解析. 信州大学医療技術短期大学部紀要, 23 : 1-8, 1998.
 - 15) Okumura N, et al. : Fibrinogen Matsumoto I: A γ 364 Asp→His (GAT→CAT), Substitution associated with defective fibrin polymerization. *Thromb Haemost.*, 75 : 887-891, 1996.
 - 16) Yee VC, et al. : Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the γ chain of human fibrinogen. *Structure*, 5 : 125-138, 1997.
 - 17) Pratt KP, et al. : The primary fibrin polymerization pocket : Three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal γ chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 389 : 455, 1997.
 - 18) Spraggon G, et al. : Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature*, 389 : 455-462, 1997.
 - 19) Doolittle RF, et al. : Crystal structures of fragments D and double-D from fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost*, 82 : 271-276, 1999.
 - 20) Weisel JW, et al. : 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.
 - 21) Everse SJ, et al. : Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 37 : 8637-8642, 1998
 - 22) Hogan KA, et al. : The formation of β fibrin requires a functional a site. *Ann New York Acad Sci*, 936 : 219-222, 2001.

受付日 : 2001年 9月27日

受理日 : 2001年11月27日