◆平成19年度日本血栓止血学会 学術奨励賞◆

フィブリノゲン γ 鎖C末端領域の立体構造の異常と フィブリノゲン組み立て・分泌・機能に対する影響の検討

可 児 里 美*

Abnormalities in γ C region of fibrinogen molecule and influences in assembly,
secretion and function of intact fibrinogen

Satomi KANI*

Key words: γ C region of fibrinogen, hypofibrinogenemia, assembly, secretion

はじめに

フィブリノゲン (Fibrinogen : Fbg) は、血液凝固カスケードの最終段階に働く分子量340kDaの糖タンパクであり、トロンビンの作用によりフィブリン (Fibrin : Fbn) に変化することで止血に寄与している。Fbgは肝臓において $A\alpha$ 鎖 (アミノ酸数610個、分子量67kDa)、 $B\beta$ 鎖 (461個、56kDa)、 γ 鎖 (411個、47.5kDa) の3種のポリペプチドが合成され、第1段階として ($A\alpha \cdot B\beta \cdot \gamma$) の複合体として組み立てられ、さらにそれがN末端でS-S結合して2量体 ($A\alpha \cdot B\beta \cdot \gamma$)₂となり血中に放出される。Fbg1分子中には58個のシステイン (Cys) があり、その全てが同一鎖内 ($A\alpha$; 2個, $B\beta$; 6個, γ ; 4個) あるいは各鎖間 ($A\alpha$ - $A\alpha$; 1個, γ - γ ; 2個, $A\alpha$ - $B\beta$; 6個, $A\alpha$ - γ ; 4個, $B\beta$ - γ ; 4個) で計29個のS-S結合を成していることで、線維状の立体構造を維持している。2量体であるFbgは3鎖鎖がそれぞれN末端側で17個のS-S結合によりcentral domainを形成しており、その部分はE領域と

呼ばれている。一方E領域を中心にして両側に対称に広がるC末端側terminal domainはD領域と呼ばれている (図1)。

このような複雑な構造であるFbgの6本のポリペプチド鎖の、肝細胞内における組み立て、分泌に関しては未だ明確にはなっていない。Fbgの分子異常症としては、血液中にFbgが存在しない無Fbg血症、蛋白質は存在するものの機能に異常を有するFbg (機能) 異常症、さらに無Fbg血症のヘテロ接合体型である低Fbg血症の3つの型が存在し、全世界で合わせて300家系以上の報告がなされている (<http://www.geht.org/databaseang/fibrinogen/>)。無Fbg血症および低Fbg血症を呈する症例報告の分子生物学的な分類の詳細については総説を参照いただきたい¹⁾。最近我々は、 γ 鎖C末端D領域 (140-411残基, γ C領域) にアミノ酸変異を有する2例の異常Fbgを見出した。CHO細胞を用いて2例と同じ変異を有するリコンビナントFbgの発現実験を行った結果、1例はFbg生成不良であり、1例は分泌不良であることを証明し、 γ 鎖C末端D領域はFbgの組み立て、

*名古屋市立大学病院中央臨床検査部 [〒467-8602 愛知県名古屋市中瑞穂区瑞穂町川澄1]

Clinical Laboratories, Nagoya City University Hospital [1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8602, Japan]

Tel: 052-858-7307 Fax: 052-858-7307 e-mail: clkani@med.nagoya-cu.ac.jp

図1 フィブリノゲンの構造

2組の α 鎖, β 鎖, γ 鎖がN末端側でcentral domainを形成しており, その部分はE領域と呼ばれている. E領域を中心にして両側に対称に広がるC末端側terminal domainはD領域と呼ばれている.

図2 ウェスタンブロッティング法による γ 153C, 153R, 153Aの細胞内の観察
 γ 鎖153C, 153Rおよび153Aを発現するベクターを導入したCHO細胞内に生成されるFbg, α , β , γ 鎖あるいはそれらの複合体を観察した. γ 鎖153R, 153Aによる変異Fbgは, 非還元(左)では観察されないが, 還元(右)すると α , β , γ 鎖はそれぞれ発現していた.

および分泌に重要な機能を果たす部分であることを報告した.

一方, C末端側から徐々に短くしたりコンビナント γ 鎖を生成させ, γ 鎖の長さとFbg分泌量の関係について解析し, 411個のアミノ酸配列のうち387までの長さがFbgの分泌にとって必須であることを明らかにした. また分泌にとってポイントとなる γ 鎖387アミノ酸について検討したところ, 側鎖の性状によりFbg生成量に差があり, また機能にも異なる影響をも

たらすことが示された.

本稿では, γ 鎖D領域の構造が有する, Fbgの生成・分泌過程における重要性, あるいはFbgの機能に果たす役割について解析してきた一連の研究成果を紹介する.

1. Fbg生成における γ 鎖D領域構造の重要性

1999年に寺澤らは, γ 鎖153Cys (C) がArg

図3 Pulse-chase 法による γ 153C, 153R のFbgの生成・分泌過程の観察

Fbg生成・分泌速度を 35 [S]-メチオニンを用いたPulse-chase法により解析した。 γ 鎖153Cでは細胞内に発現された $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖がFbgに組み立てられ、培養液に分泌されていく過程が観察されたが、 γ 鎖153Rによる変異Fbgでは、組み立てられたFbg,あるいは中間複合体は細胞内にも培養上清にも認められなかった。

(R)に変化したヘテロ接合性変異である低Fbg血症, Fbg Matsumoto IV (M・IV)を報告した。これは1塩基置換により1アミノ酸変異を生じることにより起因する欠損症ヘテロ症例であり、欠損原因を分子生物学的に解明した世界初の報告であった。症例の血中Fbg濃度は活性量0.81g/L, タンパク量0.87g/L(基準範囲; 1.80-3.50g/L)であった。低Fbg値を示す原因は、 γ 153CがRに変異することにより同一 γ 鎖内の153C-182CのS-S結合が形成されず、したがって γ 鎖D領域に著しい構造変化をもたらすことによるものと推察された。これを確認するために、 γ 鎖cDNAを組み込んだプラスミドpMLP- γ を用いてoligonucleotide-directed mutagenesis法により γ 鎖153RとA(Ala)を発現するベクターを作製し、正常 $A\alpha$ 鎖と $B\beta$ 鎖を発現しているCHO細胞へそれぞれ導入した。培養上清および細胞溶解液のFbg量はELISA法により定量し、細胞内のFbg, $A\alpha$,

$B\beta$, γ 鎖あるいはそれらの複合体, および培養上清中Fbgはウェスタンブロッティング法により観察した(図2)。さらにFbg生成・分泌速度を 35 [S]-メチオニンを用いたPulse-chase法により解析した(図3)。その結果、 γ 鎖153RまたはAによる異常Fbgおよびその中間複合体は細胞内にも培養上清にもまったく認められなかった。近年HepG2細胞やCOS-1細胞を用いたさまざまな研究から、Fbgの組み立ては $A\alpha$ - γ および $B\beta$ - γ の二種のヘテロダイマー形成から始まり $B\beta$ 鎖の合成が律速因子となって進行するという報告がある²⁾。 γ 鎖153C-182CによるS-S結合が破綻すると、D領域に構造的な変化が生じて $A\alpha$ - γ および $B\beta$ - γ が形成できなくなり、Fbgの合成が障害されることが明らかとなり、 γ 鎖D領域の構造がFbgの組み立てにおいて極めて重要な役割を果たしていることが示された³⁾。

図4 短い γ 鎖による変異Fbgの生成量

γ 鎖を411, 406, 401, 395, 390, 387, 386, 385, 384, 379までの長さになるように発現させ、細胞内と培養液中のFbg量を測定した。387-411までの長さによるFbgは細胞内、培養液ともに観察されたが、386までのものは細胞内にごくわずかに生成されていたが、培養液中には認められなかった。

2. 分泌されるには γ 鎖の長さはどこまで必要だろうか？

2002年に奥村らは、Fbgの生成、分泌にとって γ 鎖のどこまでの長さが必要であるのかを検討した。まず、 γ 鎖411個のアミノ酸をC末端側から徐々に短くして379個から406個までの9種類の長さのFbgを生成するような変異プラスミド(pMLP- γ 406, 401, 395, 390, 387, 386, 385, 384, 379)を作製した。正常 γ 鎖(pMLP- γ 411)と合わせて10種類のプラスミドを、正常A α 鎖、B β 鎖を発現しているCHO細胞へ導入し、細胞内でのFbgの生成量と培養液中への分泌量を測定した。その結果、387以上の長さの γ 鎖から成るFbgは、ほぼ長さに比例した量が細胞内に生成され分泌されていたが、386以下の短い γ 鎖によるFbgは細胞内には極めて少量であり、分泌量は検出限界以下であった(図4)。これらの細胞内の生成物についてウェスタンブロッティング法を用いて観察したところ、386以下の4種類の短い γ 鎖はいずれも細胞内には作られているものの、Fbgに組み立てられていないことが判明した。これらの細胞内のmRNA量をRT-PCR法により定量しGAPDH・mRNA量により補正して比

較したところ、分泌される場合とされない場合との間にはmRNA合成量に有意差は認められなかった。したがって分泌されない原因は、短い γ 鎖のmRNA合成量低下によるものではなく、発現されるもののFbgの組み立てに参画できないことによるものであった。この結果から γ 387IleはFbgの組み立てを規定する極めて意味のある構造あるいは性質を有することが示唆された⁴⁾。

3. γ 387側鎖の違いによる生成量の相違

γ 鎖387IleはD領域中に存在するanti-parallel β シート(β 1- β 5)の β 4ストランドの終了部分に位置している(図5)。先に述べた研究から、 γ 387が持つ構造あるいは性質がFbgの組み立てに重大な影響を与えることが示された。そこで我々は γ 鎖387アミノ酸側鎖の違いによる γ 鎖D領域の機能の相違について検討を行なった。

ヒトを含めた数種におけるFbg γ 鎖387アミノ酸を比較してみると、ヒトの γ 鎖387はウシ、ラット、ニワトリと共通のIle(I)であるが、ヤツメウナギではLeu(L)、カエルではMet(M)である。一方、ヒトのFbgB β 鎖は γ

図6 変異 γ 387鎖によるFbgの生成量

γ 387IをR, L, M, A, Dに変異させ、培養液(左)と細胞内(右)のFbg濃度を測定した。R, L, M, AではIの場合と同量かそれ以上に生成、分泌されていたが、Dでは極めて少量であった。

図7 ウェスタンブロッティング法による γ 387Dの細胞内の観察
 γ 387Dの細胞内には非還元(左)、還元(右)ともに γ 387Iと同様に、Fbg, A α , B β , γ 鎖、それらの複合体が観察された。

鎖とのホモロジーが高く、共通の祖先から分岐したものと考えられているが、 γ 鎖387に相当するアミノ酸配列であるB β 鎖455は、IではなくArg(R)である⁵⁾。

以上のことを踏まえ、我々はpMLP- γ 387IをR(B β 鎖455に相当、+荷電)、L, M, Ala(A)(対照)、Asp(D)(対照、-荷電)の5

種類に変化させたベクターを作製し、I(wild type)のものと合わせて6種類を正常A α 鎖、B β 鎖を発現しているCHO細胞へ導入した。培養上清中および細胞溶解液のFbg濃度をELISA法により測定したところ、培養上清中および細胞内ともに、 γ 387R, γ 387L, γ 387M, γ 387Aの4種の変異Fbg濃度は、 γ 387I(wild

図8 変異 γ 387鎖によるフィブリン重合試験

トロンビンによるフィブリン重合を350nmにより観察した。吸光度増加の傾き (V_{max})、重合度を表す最大吸光度 (30分後の Δ Abs) はともに、 γ 387Iの場合に比べて γ 387Mと γ 387Lでは著しい低下が見られ、 γ 387Rと γ 387Aではわずかに低下していた。

type) と同等量か、またはそれ以上であった。ところが γ 387Dは、 γ 387Iの場合に比べて培養上清中では3.3%と極めて低く、細胞溶解液中では約30%程度であった (図6)。

この γ 387Dの細胞溶解液について、 γ 387Iと、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖のみを発現しているCHO細胞 ($A\alpha \cdot B\beta$) のものを対照に、ウェスタンブロッティング法を用いて解析を行なった。その結果、 γ 387Dの細胞内には、正常な $A\alpha$ 鎖・ $B\beta$ 鎖と異常な γ 鎖が、 γ 387Iの場合とほぼ同じ程度に発現されていた (図7)。すなわち、 γ 387Dの変異 γ 鎖は細胞内に発現されるものの、Fbgへと組み立てられる量が少ないために分泌量も少ないことが明らかになった。これらの結果から、Fbgの組み立てには387個のアミノ酸数が必須であるだけでなく、 γ 387側鎖によっても異なる影響を及ぼすことが示された⁵⁾。

4. γ 387側鎖の違いによる機能の相違

それでは、分泌された γ 387変異Fbgは、側鎖の違いによって機能的にはどのような相違があるのだろうか？

細胞外への分泌が確認できた γ 387R、 γ 387L、 γ 387M、 γ 387Aと γ 387I (wild type) の5種類のCHO細胞をローラボトルにより大量培養し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、機能試験を行なった。

まず始めに、十分な濃度が得られた5種類のFbgにトロンビンを添加しフィブリン重合試験を行なった。Fbg 0.17mg/mLに対し α -トロンビン 0.05U/mL、 Ca^{++} 1mMを混和し、直ちに350nmにおける吸光度変化を経時的に記録した。吸光度増加の傾き (V_{max})、および重合度を表す最大吸光度 (30分後の Δ Abs) を比較すると、 γ 387Iの場合に比べて γ 387Mと γ 387Lでは V_{max} 、 Δ Absともに著しい低下が見られ、 γ 387Rと γ 387Aではわずかに低下していた (図8)。 V_{max} はプロトフィブリルの側々結合の速度を表わすことから、 γ 387IがMまたはLに変異した場合には側々結合の速度低下をもたらすことが認められた。このように形成されたフィブリン繊維を電子顕微鏡で観察したところ、重合機能低下が見られた γ 387MとLでは、フィブリン繊維の径は他の3種に比べて細く、 Δ Absの大きさと繊維の太さは逆比例の関係にあ

図9 SDS-PAGEによるクロスリンクの観察

活性化第XIII因子により変異γ387鎖によるFbgをクロスリンクさせ、SDS-PAGEにより観察した。γ387Rの場合に最もγ-γダイマーの形成の遅延と低下が見られた。デンストメトリーによるγ-γダイマー/β鎖濃度比と時間軸のグラフ(D)からも確認した。γ387I (◆), R (△), L (▲), M (■), A (□)で示した。

るという報告と一致していた。

次に、第XIII因子によるフィブリンのクロスリンクについて観察した。5種類のFbg 0.25mg/mLに、α-トロンビン0.07U/mL, Ca⁺⁺ 0.67mMをそれぞれ混和し、あらかじめα-トロンビン0.05U/mLにより活性化した第XIII因子3.3U/mLを添加して、経時的に0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20分間加温した後、反応を停止させた。このようにして作製した泳動用サンプルを還元的条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動法(SDS-PAGE)により解析した。その結果、γ387I, γ387L, γ387M, γ387Aでは2分後から同程度のγ-γダイマー形成が見られたが、γ387Rの場合ではγ-γダイマー形成の遅延ならびに低下が見られた(図9)。これを客観的に評価するためにデンストメトリーを行なった。Bβ鎖はトロンビンによりフィブリノペプチドBを放出してβ鎖に変化するが、Aα鎖とγ鎖と異なりクロスリンクされることがないために、同一サンプル内のβ鎖バンド濃度を基

図5 γ 鎖 C 末端 D 領域の三次元構造
 β シート構造は $\beta 1-5$ に示されている。
 $\gamma 387\text{I}$ は $\beta 4$ ストランドの終了部位に位置している。

図10 Swiss-PDB viewer による変異 $\gamma 387$ 立体構造の予想図

$\gamma 387\text{I}$ と $\gamma 245\text{A}$, $\gamma 389\text{Phe}$ (F)の間には3つの水素結合が存在する。 $\gamma 387\text{L}$, $\gamma 387\text{M}$, $\gamma 387\text{A}$ の場合も同様である。 $\gamma 387\text{D}$ は3つの水素結合に加え, $\gamma 154\text{Q}$, $\gamma 190\text{G}$, $\gamma 388\text{P}$ との間に新たな4つの水素結合を生ずる。 $\gamma 387\text{R}$ では3つの水素結合に加え, $\gamma 391\text{R}$ との間に新たに2つの水素結合が存在し, また $\gamma 191\text{T}$ との間に立体構造妨害が生じると推測されている。

表1 デンシトメトリーによる γ N/ γ Δ -CHO 細胞から生成された Fbg の γ N, γ Δ 比

	clone numbers of γ Δ / γ N-CHO cell						mean $\pm$ SD
	4	11	20	35	41	56	
γ N/ (γ Δ + γ N) in cell lysates $\times 100\%$	56	28	56	66	69	70	57.5 $\pm$ 15.7
γ N/ (γ Δ + γ N) in media $\times 100\%$	85	48	67	77	87	89	75.5 $\pm$ 15.7
% γ N in media/ % γ N in cell lysates	1.52	1.71	1.26	1.17	1.26	1.27	1.37 $\pm$ 0.21*

* : $p < 0.02$ unpaired t -test for 1.00

準にして γ - γ ダイマー濃度の割合を求めて数値化した。この γ - γ ダイマー / β 鎖濃度比と時間軸のグラフからも、 γ 387 が R に変異した場合には γ - γ ダイマー形成が遅延ならびに低下することが確認された (図9)。このように、 γ 387I が M または L に変異した場合と、R に変異した場合では機能異常の種類が異なっていた⁵⁾。

5. Swiss-PDB viewer による 変異 γ 387 の立体構造

一連の解析結果から、細胞内における Fbg の合成・分泌過程において、 γ 387 までの長さだけでなく、 γ 387 側鎖の違い、すなわちアミノ酸の種類に基づく構造も重要であることが分かった。 γ 387 側鎖の違いにより推測される γ 鎖 D 領域の性状あるいは三次元構造の変化は、フィブリン重合能と第 XIII 因子によるクロスリンクの2つの機能に異なる影響を及ぼしていた。

そこで Swiss-PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv>) を用いて、 γ 387I (wild type) および変異型 γ 鎖 C 末端の立体構造予測の図を見てみる (図10)。 γ 387I は、 γ 189-197/381-388/246-252 からなる anti-parallel β シート構造の中央のシートの終了部分に位置している。I は疎水性側鎖であるが γ 387I の骨格と γ 245A および γ 389Phe (F) の骨格との間には3つの水素結合が存在する。同じく疎水性側鎖である

γ 387L, γ 387M, γ 387A の場合も、同様に3つの水素結合を持っている。一方、親水性側鎖である γ 387D においては、先の3つの水素結合に加え、D の側鎖と γ 154Q, γ 190G および γ 388P の骨格との間に新たな4つの水素結合を生じている。次いで親水性側鎖の γ 387R について見てみると、 γ 387I と同様の3つの水素結合の他に、R の側鎖と γ 391R の骨格との間に新たに2つの水素結合が存在しており、更には γ 191T との間に立体構造妨害が生じると推測されている。これらの新たに付加された水素結合あるいは立体構造妨害は、 γ 鎖 C 末端 D 領域の立体構造を著しく変化させる。我々の解析では新たに4つの水素結合が生じた γ 387D は細胞内での Fbg 生成量もその分泌量も極めて低下していた。一方、新たな2つの水素結合と立体構造障害が予想される γ 387R は生成量、分泌量、フィブリン重合試験はいずれも γ 387I の場合とほぼ一致していたものの、XIII 因子によるクロスリンク (γ - γ ダイマー) の形成は明らかに減少していた。 γ 387 側鎖の性質による γ 鎖 D 領域の構造変化の違いは、Fbg の機能異常の種類および程度にも異なる影響を与えることが認められた。

6. Fbg Otsu-I にみる γ 鎖 D 領域 構造変化と分泌障害

2003 年、我々は γ 鎖 C 末端 D 領域に位置す

図 11 Pulse-chase 法による $\gamma\Delta 319 \cdot 320$ Fbg の生成・分泌過程の観察

γ N-CHO (A), γ -CHO (B), γ N/ $\gamma\Delta$ -CHO 細胞 (C) による Fbg の生成・分泌過程を観察した。 γ N (A) と γ N/ $\gamma\Delta$ (C) の場合はほぼ同様であった。(B) の $\gamma\Delta$ では Fbg のバンド濃度は弱いものの、各鎖の生成、複合体の組み立て過程、chase 3 時間後から 24 時間後までの分泌量が漸増していく様子には γ N と γ N/ $\gamma\Delta$ の場合と比べ違いは認められなかった。

る 319Asn, 320Asp を欠く異常 Fbg Otsu-I を報告した⁶⁾。この症例の血中 Fbg 濃度は活性量 0.27g/L, タンパク量 1.77g/L (基準範囲; 1.80-3.50g/L) であり、フィブリン重合能は極めて低下していた。血漿中の Fbg をウェスタンブロットング法で観察すると、患者 Fbg には 2 本の γ 鎖が存在し、変異 γ 鎖は理論値より 2kDa 程度低分子量と計算された。これは 2

アミノ酸の欠落による構造変化により移動度が変わり、見かけ上低分子にみえるものと考えた。これらの 2 アミノ酸をコードしている 6 ヌクレオチドを欠いたプラスミド pMLP- $\gamma\Delta 319 \cdot 320$ ($\gamma\Delta$) を作製した。正常 γ 鎖 (γ N), 変異 γ 鎖 ($\gamma\Delta$), 正常 γ 鎖と変異 γ 鎖プラスミドを等量混ぜたもの (γ N/ $\gamma\Delta$) を、正常 A α 鎖, B β 鎖を発現している CHO 細胞へそ

図12 $\gamma\Delta$ 319・320Fbgの分泌量の経時的変化
 γ N-CHO細胞(●), $\gamma\Delta$ -CHO細胞(▲), γ N/ $\gamma\Delta$ -CHO細胞M(■)によるFbg分泌量を1日目から6日間測定した。6日後の $\gamma\Delta$ 分泌量は γ Nの28%, γ N/ $\gamma\Delta$ は79%であった。

れぞれ導入してFbgを生成させた。生成Fbg量はELISA法により定量し、細胞内のFbg, A α , B β , γ 鎖あるいはそれらの複合体、および細胞外に分泌されるFbgはウェスタンブロッティング法により観察した。さらにFbg生成・分泌速度を³⁵[S]-メチオニンを用いたPulse-chase法により解析した。まず生成されたFbg量濃度を培養上清と細胞溶解液中濃度の比でみると、 γ Nが1, $\gamma\Delta$ が0.4, γ N/ $\gamma\Delta$ がほぼ中間の0.6であった。次にウェスタンブロッティング法の結果をみると、 γ N/ $\gamma\Delta$ には2本の γ 鎖があり、デンストメトリーの結果では、細胞内では γ N: $\gamma\Delta$ はほぼ1.4:1の割合で生成されていたが、培養液中では3:1であった(表1)。Pulse-chase法の結果では、 γ Nと γ N/ $\gamma\Delta$ の場合は細胞内での生成過程も分泌されるまでの時間もほぼ同様であったが、 $\gamma\Delta$ では細胞内および細胞外に分泌されたFbgのバンド濃度は弱いものであった。しかし $\gamma\Delta$ の細胞内での各鎖の生成、複合体の組み立て過程、およびchase 3時間後から24時間後までの分泌量が漸増していく様子には γ Nと γ N/ $\gamma\Delta$ の場合と比べてほとんど違いがみられないことから、 $\gamma\Delta$ では分泌が障害されている可能

性が示された(図11)。そこで培養上清に分泌されるFbg量を経時的に測定したところ、6日後では γ Nに比べ $\gamma\Delta$ は28%, γ N/ γ は79%であった(図12)。以上のことから、この γ 鎖C末端D領域の319, 320の2アミノ酸欠失変異 γ 鎖によるFbgは分泌障害を受けるものの、Fbgの組み立てに必要な構造は保たれていることが示された⁷⁾。

このOtsu-Iと全く同じ変異が1991年にKoopmanらによりFbg Vlissingenとして報告されている⁸⁾。その後HoganらのFbg Vlissingenのマウスモデルによる実験結果では、ヘテロ接合体モデルの血中Fbg濃度はwild typeの50%, ホモ接合体モデルでは12%であった⁹⁾。これらの結果から $\gamma\Delta$ 319・320 Fbgは細胞内で生成され、血中に分泌されるものの、その分泌量は細胞内で生成される量よりもはるかに少なく、Fbg Otsu-IにみられるFbg血中濃度の低下は、分泌の減少によるものと結論した。

おわりに

Fbg は 340kDa の巨大で複雑な線維状構造であるがゆえに、構造と機能との関係の全容を明らかにすることは難しい。しかし 3 種類 6 本鎖からなる複雑な構造が、どのような過程を経て会合し、組み立てられ、分泌されていくのかを明らかにするのは大変興味あるところである。最近、Duga らを始めとする変異 B β を用いた B β 鎖の機能に関する研究により、細胞内に変異 Fbg が生成されるものの、培養液中には認められないことから、B β は組み立てではなく、分泌に関与していることが明らかにされた¹⁰⁾⁻¹²⁾。我々は、Fbg の細胞内での会合、組み立てには γ 鎖C末端D領域がその過程において重要な機能を有する部分であることを明らかにしたことから、この領域の構造変化を引き起こす変異 γ 鎖を作成して、Fbg の生成過程の観察および機能解析を行なってきた。今後は γ 鎖内に形成されるもうひとつのS-S結合である326C-339Cを始めとして、さらなる1アミノ酸置換により想定される構造変化と、生成・分泌への関わり、およびFbg機能の相違を検討していく予定である。そこから、Fbgの組み立てに必須の構造、あるいは複合体構成の機序、分泌に至る過程を解明できるものと期待している。

謝 辞：本研究を進めるにあたり、ご指導を賜りました信州大学医学部保健学科 奥村 伸生教授、寺澤 文子先生、信州大学医学部病態解析診断学講座 勝山 努教授、東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科 戸塚 実教授、信州大学医学部附属病院臨床検査部 山内 一由技師長に、深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Asselta R, Duga S, Tenchini ML : The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *J Thromb Haemost* **4** : 2115-2129, 2006.
- 2) Zang JZ, Redman C : Fibrinogen assembly and secretion. *J Bio Chem* **271** : 30083-30088, 1996.
- 3) Terasawa F, Okumura N, Kitano K, Hayashida N, Shimozaki M, Okazaki M, Lord ST : Hypofibrinogenemia associated with a heterozygous missense mutation γ 153Cys to Arg (Matsumoto IV) : In vitro expression demonstrates defective secretion of the variant fibrinogen. *Blood* **94** : 4122-4131, 1999.
- 4) Okumura N, Terasawa F, Tanaka H, Hirota M, Ota H, Kitano K, Kiyosawa K, Lord ST : Analysis of fibrinogen γ -chain truncations shows the C-terminus, particularly γ Ile387, is essential for assembly and secretion of this multichain protein. *Blood* **99** : 3654-3660, 2002.
- 5) Kani S, Terasawa F, Yamauchi K, Tozuka M, Okumura N : Analysis of fibrinogen variants at γ 387Ile shows that the side chain of γ 387 and the tertiary structure of the γ C-terminal tail are important not only for assembly and secretion of fibrinogen but also for lateral aggregation of protofibrils and XIIIa-catalyzed γ - γ dimer formation. *Blood* **108** : 1887-1894, 2006.
- 6) Terasawa F, Hogan KA, Kani S, Hirose M, Eguchi Y, Noda Y, Hongo M, Okumura N : Fibrinogen, in Otsu I (ed) : A γ Asn319, Asp320 deletion dysfibrinogen identified in an asymptomatic pregnant woman. *Thromb Haemost* **90** : 757-756, 2003.
- 7) Kani S, Terasawa F, Lord ST, Tozuka M, Ota H, Okumura N, Katsuyama T : In vitro expression demonstrates impaired secretion of the γ Asn319, Asp320 deletion variant fibrinogen. *Thromb Haemost* **94** : 53-59, 2005.
- 8) Koopman J, Haverkate F, Briet E, Lord ST : A congenitally abnormal fibrinogen (Vlissingen) with 6-base deletion in the γ -chain gene, causing defective calcium binding and impaired fibrin polymerization. *J Biol Chem* **266** : 13456-134561, 1991.
- 9) Hogan KA, Merenbloom BK, Kim HS, Lord ST : Neonatal bleeding and decreased plasma fibrinogen levels in mice modeled after the dysfibrinogen Vlissingen/Frankfurt IV. *J Thromb Haemost* **2** : 1484-1487, 2004.
- 10) Duga S, Asselta R, Santagostino E, Zeinali S, Simonc T, Malcovati M, Mannucci PM, Tenchini ML : Missense mutations in the β fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. *Blood* **95** : 1336-1341, 2000.
- 11) Spena S, Asselta O, Duga S, Malcovati M, Peyvandi F, Mannucci PM, Tenchini ML : Congenital afibrinogenemia : intracellular retention of fibrinogen due to a novel W437G mutation in the fibrinogen B β -chain gene. *Biochim Biophys Acta* **1639** : 87-94, 2003.
- 12) Vu D, Bolton-Maggs PHB, Parr JR, Morris MA, de Moerloose P, Neerman-Arbez M : Congenital afibrinogenemia : identification and expression of a missense mutation in *FBG* impairing fibrinogen secretion. *Blood* **102** : 4413-4415, 2003.