◆総 説◆

線溶系の始動と調節 : フィブリノゲンの
異常分子から新たに何を学んだか

松 田 道 生*

Initiation and Regulation of Fibrinolysis : What We Have Learned
A new from Abnormal Molecules of Fibrinogen ?

Michio MATSUDA*

Key words : fibrinolysis, tissue-type plasminogen activator (t-PA), fibrin-facilitated t-PA-catalyzed plasminogen activation, abnormal fibrinogen, extra plasmin-cleavage site

はじめに

内因系線溶機構 (intrinsic fibrinolysis) の始動にフィブリン (fibrin, Fbn) の存在が必要とされ、その反応に与かる部位として Fbn の α 鎖 (148-160) 残基ペプチド断片が目されている¹⁾²⁾。また最近、 γ 鎖 (311-336) 残基ペプチド断片にも第2の反応部位の存在が示唆された³⁾。これらの反応部位はフィブリノゲン (fibrinogen, Fbg) 分子にあっては内臓されているが、Fbg→Fbn 転換に伴って表面に現われ、線溶系に関与する諸因子と反応するものとされている。しかし、Fbg→Fbn 転換反応はトロンビンによるフィブリノペプチド A, B (fibrinopeptides A and B, FPA および FPB) の切断・放出に始まり、生じたフィブリン・モノマー (Fbn monomers) の重合と活性型第 XIII 因子による分子間架橋形成に到る長い道のりを経て達成される一連の反応である。この反応に於て、線溶系の補酵素として働く Fbn にどのような条件が要請されるのか、とくに Fbn の構造として何が要求されるのかという観点からの検

索は数少ない。

線溶機構への関与だけでなく、Fbg や Fbn は実に多彩な機能を持ち、数々の生理的役割を担っているが、これらをより間近に観察する一つの手立てとして異常 Fbg 分子での機能と構造との関係を眺める方法がある。幸い著者らはこの数年、本邦だけでなく南米、ドイツ、韓国などからの異常 Fbg 分子を分析する機会に恵まれ、その中に全く新しい変異型をいくつか同定することができた。参考までに今日変異が同定されている異常 Fbg を表1にあげておく。面白いことに、南米の Lima (Peru) と Caracas (Venezuela) から依頼された異常 Fbg 分子は後述するように A α 鎖に点変異を有し、ともに点変異のために新たに糖付加構造 (glycosylation sequence) が形成されていることが判明した。しかもシアル酸に富む2分岐アンテナ様構造をもつ余剰糖鎖が変異部そのもの (Fbg Caracas II)、またはその2残基アミノ基末側に付着していた (Fbg Lima)。これらの分子から組織型プラスミノゲン・アクチベータ (tissue-type plasminogen activator, t-PA) を介して進む線

* 自治医科大学血液医学研究部門止血血栓 (〒 329-04 栃木県河内郡南河内町葉師寺 3311-1) : Division of Hemostasis and Thrombosis Research, Institute of Hematology, Jichi Medical School, Tochigi, 329-04,

表 1A Structure-elucidated Abnormal Fibrinogens I

Molecular and genetic defects		Abnormal fibrinogen
Aα chain		
Asp-7	→ Asn (GAC→AAC)	Lille
Gly-12	→ Val (CCA→CTA)	Rouen
Arg-16	→ His (CGT→CAT)	Bicetre*, Giessen I*, Manchester [§] and other >30
	→ Cys (CGT→TGT)	Metz*, Zurich I and other >30
Gly-17	→ Val (GGC→GTC)	Breman
Pro-18	→ Leu (CCA→CTA)	Kyoto II
Arg-19	→ Ser (AGG→AGT)	Detroit*
	→ Asn (AGG→AAT/AAC)	Munich I
	→ Gly (AGG→GGG)	Aarhus*, Mannheim I
Arg-141	→ Ser (AGA→AGC/AGT)	Lima*†
Ser-434	→ Asn (AGC→AAC)	Caracas II‡
Lys-461	~ Val-610→deleted (AAA for Lys-461→TAA, Stop)	Marburg I*
Ser-532	→ Cys (TCT→TGT)	Caracas V#
Arg-554	→ Cys (CGT→TGT)	Dusard#
Aβ chain		
Arg-14	→ Cys (CGT→TGT)	Christchurch II, Seattle I
Gly-9	~ Leu72→deleted (corresponds to exon 2)	New York I
Gly-15	→ Cys (GGT→TGT)	Ise
Arg-44	→ Cys (CGT→TGT)	Nijmegen#
Ala-68	→ Thr (GCT→ACT)	Naples**
Ala-335	→ Thr (GCC→ACC)	Pontoise†

* homozygote

† associated with extra glycosylation at two residues-N-terminal Asn

‡ associated with extra glycosylation at the Asn substitution

determined by gene analysis (polymerase chain reaction, PCR)

§ verified by gene analysis (PCR)

溶機構の一側面を垣間見ることができたので、本稿ではその辺の情報を紹介したい。また、別の諸分子では点変異による基質の変化から Fbg あるいは Fbn のプラスミン (plasmin, Plm) による分解パターンが変わったり、Plm に対する感受性に变化を来したりしたものである。本稿では構造異常が同定されている分子に限って取り上げて、今日判っている情報を小括したい。

1. 線溶機構の始動に関与する Fbn 側の要件

1) t-PA に触媒されるプラスミノゲンの活性化

t-PA に触媒されるプラスミノゲン (plasminogen, Plg) → Plm 転換反応には反応の場として Fbn の共存が必須とされる。すなわち Fbg 分子にあっては分子の内部に埋没している反応

部位が Fbg の Fbn への転換に伴って分子表面に露呈されるものと考えられる¹⁾⁻⁴⁾。このとき Fbn 側の要件として単一の Fbn 分子としての構造変化だけで必要十分なのか、あるいは Fbn 分子が何個か結合したオリゴマー (oligomer) ないしポリマー (polymer) や、ゲル化への中間体あるいは Fbn ゲルそのものが必要とされるのかということは、Fbn ゲルの形成とこれによって始動される内因性線溶機構の分子機作を理解する上で重要と思われる。周知の如く、Fbn 分子 (Fbn・モノマー) の重合は、2 分子が半分子長ずつずれた形で重なるように結合 (ダイマー, dimer の形成) することによって始まり、これに第 3 の分子がまた半分子長ずれて結合 (トリマー, trimer の形成) した後、同様の結合が進んで一定の長さのオリゴマーを形成するものと考えられている⁵⁾。図 1 に示す Fbn・モノ

表 1B Structure-elucidated Abnormal Fibrinogens II

Molecular and genetic defects			Abnormal fibrinogen
γ chain			
Arg-275	→ His	(CGC→CAC)	Haifa, Bergamo II, Essen, Perugia, Saga, Osaka III
	→ Cys	(CGC→TGC)	Tochigi I, Osaka II [§] , Tokyo II, Morioka, Baltimore IV
Gly-292	→ Val	(GGC→GTC)	Baltimore I [§]
Asn-308	→ Lys	(AAT→AAG)	Kyoto I [§]
	→ Ile	(AAT→ATT)	Baltimore III
Met-310	→ Thr	(ATG→ACG)	Asahi ^{†§}
Asn-319 and Asp-320 → deleted (AATGAT→deleted)			
Asp-318	→ Gly	(GAC→GGC)	Giessen IV [#]
Gln-329	→ Arg	(CAG→CGG)	Nagoya
Asp-330	→ Val	(GAT→GTT)	Milano I
	→ Tyr	(GAT→TAT)	Kyoto III [§]
Asn-337	→ Lys	(AAC→AAA)	Bern I [#]
Insertion of 15 amino acids after Gln-350, and Gly-351 → Ser (A→G at position 6588 within intron 8, and insertion of 45 bp fragment between exons 8 and 9)			Paris I [#]
Ser-358	→ Cys	(TCT→TGT)	Milano VII [#]
Arg-375	→ Gly	(CGG→GGG)	Osaka V

[†] associated with extra glycosylation at two residues-N-terminal Asn

[#] determined by gene analysis (polymerase chain reaction, PCR)

[§] verified by gene analysis (PCR)

図 1 フィブリン (Fbn)・モノマーの重合による 2 本鎖原線維の形成とその側々結合のモデル

上段: D・D 間が架橋結合された 2 本鎖原線維 (架橋を黒丸で示す)

下段: 上記の架橋結合を持たない 2 本鎖原線維

このような原線維間の結合は矢印で示すような新しい側々結合が関与しているものと考えられるが、まだ同定されていない。

マーの重合モデルから明らかなように、このオリゴマーないしポリマーは必ず 2 本鎖から成ること (2 本鎖原線維, two-stranded protofibrils), Fbn のゲル化にはこの 2 本鎖原線維が一定の長さに達すると側面で互いに結合し合うこと (側々結合, lateral association) が必要となる⁵⁾。Fbn の重合反応を 350 nm の波長で捉え

る方法が巷間広く試みられているが、この時、2 本鎖原線維の形成までの過程は A_{350} には何ら影響せず、2 本鎖原線維が側々結合し始めることによって初めて A_{350} が上昇して来ることが知られている。

著者らが最近分析する機会を得た 2 つの異常 Fbg 分子、Fbg Caracas II⁶⁾ と Fbg Lima⁷⁾ は

先に述べたように、これら 2 つの異常分子での機能障害は Fbn のゲル化反応の著しい遅延であり、Fbn・モノマーの重合反応の過程のどこかが障害されているものと考えられたが、面白

因みに正常 Fbg での糖付加構造は β 鎖, γ 鎖とも Asn-X-Thr 型であり, Fbg Lima での Asn-X-Ser 型はユニークな所見である。(文献 6 および 7 による)。

	Caracas II	Lima	Normal
A	3.6%	3.0%	15.1%
B+C	14.5%	28.4%	62.5%
D	81.9%	68.6%	22.4%

図 3 Fbg Caracas II および Fbg Lima で同定された 2 分岐アンテナ様骨格をもつ余剰糖鎖とその断片に付加されたシアル酸による相違。これらの異常分子ではともにシアル酸 2 個をもつ D 型のものが主体を成している。正常 Fbg の糖ではシアル酸含量は低く B+C 型が多い (文献 6 および 7 による)。

Activation of Plasminogen by t-PA

図 4 Fbg→Fbn 転換によって促進される t-PA を介したプラスミノゲンの活性化。Fbg をイムノプレートに固相化し、トロンビン処理後に t-PA, Plg および S-2251 を加え、形成されるプラスミンによる合成基質の分解を経時的に測定した（一部は文献 6 による）。各異常分子のもつ構造変化については表 1 A, B および表 2 を参照されたい。

いことに、t-PA に触媒される Plg→Plm 転換反応は異常分子由来の Fbn 共存下でも正常に進展した（図 4, 5）。とくに図 5 に Fbg Lima での成績として示したように、Fbn・モノマーが重合する条件下で経時的に Plm の生成を観察すると正常 Fbn・モノマーでの成績と全く同様であり、Fbn ゲル化障害があるにも拘わらずこれら 2 つの異常分子でも t-PA を介して進む Plg→Plm 転換反応は正常に営まれていることが判明した⁶⁾⁷⁾。この観察が正しいものとする、t-PA による Plg→Plm 転換反応には肉眼で識別可能な Fbn・ゲルの形成は必須ではなく、これに先行する、ゲル化への中間体の形成で必要十分ということになる。シアル酸に富む余剰糖鎖をもつこれら 2 つの異常 Fbg 分子からシアル酸を除去したところ Fbn の重合反応は Fbg Caracas II では完全に（図 6）、また Fbg Lima もほとんど完全に（図 7）正常化した。以上の結果を総合すると、これらの異常分子では初期の 2 本鎖原線維の形成は正常に進展し、t-PA との結合部位も露呈され、これを介して Fbn 分子上で Plg→Plm 転換反応が滞りなく進展したものと理解される。次いで、このように形成された 2 本鎖原線維が互いに側々結合（lateral association）することによって太い Fbg 束を形造って行く過程で、図 8 の Fbg Caracas II での模

図 5 正常および Fbg Lima 由来の Fbn・モノマーの重合に伴って促進される t-PA による Plg の活性化（文献 7 による）。

式で示したように、余剰糖鎖に付加されたシアル酸に由来する強い陰性荷電のために、接近し合う 2 本鎖原線維間で反撥力（repulsive forces）を生じ、Fbg のゲル化が遅延したものと判断される。すなわち、初期の 2 本鎖原線維の形成とその側々結合反応とは Fbn のゲル化の過程ではそれぞれ独立した反応系であり、Fbn による線溶系の始動は明らかに前者によって司どられていることになる。これを支持する所見として、Fbg の Plm 分解産物 fragment X のトロンビン処理後に促進される t-PA を介した Plg→Plm 反応の実験が同じ頃 Suenson らによって報告された⁹⁾。すなわち、Fbg から

A. Thrombin Time (sec)

	Normal	Patient
Before	16.2	32.4
After	8.4	10.2

B. Fibrin Monomer Polymerization

図6 脱シアル処理によるトロンビン時間 (A) および Fbn・モノマーの重合反応の改善 (B)—Fbg Caracas II. Bにおいて Pn, Pd は Fbg Caracas II の脱シアル処理の前と後; Nn, Nd は正常 Fbg での脱シアル前と後.

A. Thrombin Time (sec)

	Normal	Patient
Before	16.2	97.4
After	8.4	8.5

B. Fibrin Monomer Polymerization

図7 脱シアル処理によるトロンビン時間 (A) および Fbn・モノマーの重合反応の改善 (B)—Fbg Lima. Bにおいて Pn, Pd は Fbg Lima の脱シアル処理の前と後; Nn, Nd は正常 Fbg での脱シアル前と後. (文献7による).

A α 鎖C末のいわゆる free swimming appendage^{11,10)}と称せられる約40 KDaの断片を欠如する Fbg 由来の fragment X をトロンビン処理して Fbn-fragment X に転換させると、きわめて遅いながらもゲル化反応が進展する。この時、反応系に t-PA, Plg と共に Plm に特異性の高い合成基質 S-2251 を添加しておくと同様の速度で Plm の生成が観察された、というのである。この時、ゲル化を A₄₇₅ で追跡しているが、Plm の生成が進む時相ではゲル化はほとんど進展していない。この結果から、Suenson らは t-PA に触媒される Plg→Plm 転換反応には (D・E・D) という基本構造をもち、A α 鎖C末の free swimming appendage を欠く Fbn-fragment X の重合反応物、すなわち、2本鎖原線維の骨格(図1参照)の形成が必須であり、これらによる次の階段の側々結合を介したゲル化反応は必要ではないと結論づけてい

る。われわれも、Suenson らとは独立してこのような仮説に基づいて実験を進めて来ていたが、Suenson らのこの実験成績はわれわれの成績によく符合するものであった。したがって t-PA を介した Plg の活性化には Fbn・モノマーによって形成される初期反応物、すなわち2本鎖 Fbn 原線維の構築が必要十分な要件と結論づけたが、実際、これを裏づけるように、Fbn・モノマーの重合反応基と考えられる部位に構造異常をもつ種々の異常分子ではこの反応系の進展はさまざまな程度に障害されていた。例えば、 γ Met-310→Thr 置換をもち、このため生じた Asn-X-Thr 型の糖付加配列によって γ Asn-308 に余剰糖鎖が結合している Fbg Asahi¹¹⁾では、D領域内の重合反応基が損傷されているため著明な重合障害が認められるが、t-PA を介した Plg の活性化促進能も有意に低下していた(図4)。その他、 γ Asp-330→Tyr 置換をもつ Fbg Kyoto III¹²⁾でも同様であり、これら

図 8 Fbg Caracas II における Fbn 重合障害を示すモデル。2 本鎖原線維は正常に形成されるが、これらが接近すると A α 鎖 C 末に付加された余剰糖鎖のシアル酸に由来する強い陰電荷のために、次の反応（側々結合）が阻害される。t-PA は構造障害部位から空間的に離れている D 領域内の γ 鎖に正常に結合している。

では重合反応基の機能不全から 2 本鎖原線維の形成が不良である。

最近遺伝子解析から B β Arg-44 $\rightarrow$ Cys 置換が明らかになった Fbg Nijmegen¹³⁾ では、t-PA を介した Plg の活性化促進作用が著しく低いことが報告されている¹⁴⁾ が、その機作についての詳細は猶不明である。ただ、置換 Cys 残基の一部（ $\sim 20\%$ ）は血清アルブミンとジスルフィド結合によって複合体を作っているとされている。この異常分子は臨床的に血栓症に結びついているので、線溶機構の障害の分子レベルの解析結果が俟たれる。

2) t-PA との結合について

t-PA の結合部位として前項で取り上げた A α (148-160) 残基ペプチド断片が CNBr 分解産物での検討から推定されている¹²⁾ が、最近、Nieuwenhuizen らのグループは t-PA との結合に与かる第 2 の部位が γ 鎖にあり、やはり CNBr 分画での検索から γ (311-336) 残基ペプチド断片がその候補者であると提唱している³⁾。これを支持する所見として、著者らは先述

の Fbg Asahi および Fbg Kyoto III で Plg 活性の低下のほか、t-PA との親和性が低下していることを認めている。すなわちトロンビン処理後の t-PA 結合能が正常分子に比較してこれらでは有意に低下していた（表 2）。当然のことながら Fbg にはこの結合能は現れないか、あっても僅かにすぎない。一方、 γ -275 位の変異体、Fbg Morioka (γ Arg-275 $\rightarrow$ Cys) ではその障害はこれらに比べれば軽度であった。また前項で紹介した（Fbg Lima）では構造障害が A α 鎖上の t-PA 結合部位に接しているにも拘わらず t-PA 結合能が正常分子のそれと同様であったことは、A α 鎖上に推定されている t-PA 結合部位は一義的（primary）なものではなく、Fbn の Plm による分解が進んだ段階で出現して来る部位とも考えられる。これらの成績だけから結論づけることは時期尚早であるかも知れないが、t-PA との結合に一義的役割を果し、線溶系の始動に関与するのは γ 鎖の (308-330) 残基あるいは (311-379) 残基やその周辺構造と言えるかも知れない。また、前項で紹介した Fbg

表 2 Binding of t-PA to Thrombin-Activated Abnormal Fibrinogens

Fibrinogen	Structural alteration	Kd $\pm$ SE, 10^{-8} M
Normal		9.5 $\pm$ 1.5
Lima	A α Arg-141 to Ser & A α Asn-139 $\cdot$ (CHO)	10.9 $\pm$ 1.2
Caracas II	A α Ser-434 to Asn $\cdot$ (CHO)	8.8 $\pm$ 1.1
Morioka	γ Arg-275 to Cys(: Cys)	10.7 $\pm$ 1.4
Asahi	γ Met-310 to Thr & γ Asn-308 $\cdot$ (CHO)	17.6 $\pm$ 2.0
Kyoto III	γ Asp-330 to Tyr	15.2 $\pm$ 2.1

(CHO) : N-glycosylated.

(: Cys) : a free Cys linked by a disulfide bridge.

Nijmegen (B β Arg-44 $\rightarrow$ Cys) でも t-PA 結合能の低下が指摘されている¹⁴⁾ が, その分子機作については明確にされていない。

以上のような成績を考慮すると, A α 鎖以外に B β 鎖アミノ基末領域や γ 鎖カルボキシル基末領域に t-PA との結合部位の存在している可能性があり, 今後, これらの周辺のアミノ酸配列をもつペプチドを合成したり, site-directed mutagenesis を応用して数々の変異ポリペプチドを作成し, 詳細な検討を進める必要があるであろう。

2. Fbn の構造は Plm への抵抗性をどう変えるか

1) カルシウム依存性の構造

正常分子での検討から γ 鎖 C 末寄りの領域内で Plm の水解を受けるペプチド結合, すなわち D₁ 分画から D₂ 分画へと分解される際に解裂される Lys-356 $\cdot$ Ala-357, D₂ 分画から D₃ 分画に移る時に開裂される Lys-302 $\cdot$ Phe-303, さらに D₂ 分画内の SS 結合内で進む Lys-338 $\cdot$ Cys-339 などのペプチド結合は γ 鎖 C 末寄りの, いわゆる高親和性カルシウム結合部位¹⁵⁾¹⁷⁾ にカルシウムが結合することにより Plm の攻撃から保護されることが知られている¹⁸⁾ (図 9)。この高親和性カルシウム結合部位は Fbg の D 領域に 1 個ずつあるほか, 中央の E 領域にも 1 個あることが指摘されており, とくに D 領域内のそれは CNBr 分画での検討から γ (311-336) ペプチド断片に局在が示唆されている¹⁹⁾。この部は calmodulin や parval-

図 9 Fbg のプラスミン分解. カルシウム存在下には, Fbg は E 分画と D₁ 分画とに分解されるが, カルシウム非存在下には D₁ 分画はさらに D₂, D₃ 分画へと分解される。

bumin のカルシウム結合部位の 1 次構造とホモロジーが高い部分である。一方, 中央 E 領域のそれは未だ特定化されていないが, CNBr 処理で得られる N-disulfide knot (N-DSK) に存在しながら, Plm 処理で得られる E 分画 (E 領域とは完全には一致しないことに注意) では欠如しているとされる²⁰⁾。

最近, PCR を応用した遺伝子解析から γ Asn-319 および γ Asp-320 を規定する 2 つのコドン, 6 塩基 (AATGAT) がそっくり欠落している異常分子, Fbg Vlissingen がオランダの

図 10 架橋フィブリンのプラスミン分解によって生じた γ 鎖断片のヘテロダイマー (Fbg Osaka V, ヘテロ接合体). 正常 γ 鎖からは (89-406/411) 残基断片 (上段) が, 異常分子からは γ 鎖の Lys (K)-373 と Thr (T)-374 間で開裂されて生じる γ (374-406/411) 残基断片 (下段) が生じ, この両者が活性型第 XIII 因子によって架橋結合された形のヘテロダイマーとして同定された (文献 22 による).

Koopman らによって同定された²¹⁾. この分子では上記のカルシウム結合部位内の 2 残基, しかも陰性荷電をもつアミノ酸が欠落していることからカルシウムとの結合能は著しく低く, カルシウム・イオン存在下でも γ 鎖 C 末の Plm による開裂部位は保護されることなく容易に水解されてしまうことが示されている. 因みにこの周辺の γ (316-323) ペプチド断片は一文字表示で, D-N-D-N-D-K-F-E と示されるようにアスパラギン酸 (D) やグルタミン酸 (E) のような酸性アミノ酸に富み, カルシウムとの結合だけでなく, D 領域内の Fbn 重合反応基とも目されている領域である.

別に必ずしも上のペプチド断片内に含まれない部位の点変異分子で高親和性カルシウム結合能が欠如し, そのためカルシウム存在下に Plm の分解を受け易い γ 鎖異常分子が 2 つ報告されている. すなわち, われわれの教室の Yoshida らが報告した Fbg Osaka V (Arg -375 $\rightarrow$ Gly)²²⁾ とスイスの Steinmann らが報告した Fbg Bern I (γ Asn-337 $\rightarrow$ Lys)²³⁾ である.

Fbg Osaka V の発端者はヘテロ接合体であり, 異常分子も正常分子とほとんど同様に分泌されていることから, 血漿中では異常分子と正常分子がほぼ等モルで共存している. 患者 Fbg を mM オーダーのカルシウム存在下に Plm 分解して行くと, 生成される D₁ 分画 (γ 鎖 C 端を完全 ($\sim\gamma$ 411) またはほとんど完全に ($\sim\gamma$ 406) 保全している) の量は正常分子での D₁ 分画生成量の約半分で, 残りの半分は γ 鎖 C

端から切り落としが進み, D₂ 分画さらに小さい D₃ 分画へと分解されてしまう. また, 活性型第 XIII 因子を作用させて安定化した Fbn 魂をカルシウム存在下に処理し, SDS-PAGE で検索すると, 正常分子の分解では認められない分子量約 123,000 の分画が, D₂, D₃ 分画のほかに出現した. これを還元処理し, γ 鎖成分を分析したところ, γ (89-406/411) 残基断片と γ (374-406/411) 残基断片とから成ることが判明した (図 10). すなわち, 前者は正常 γ 鎖由来, 後者は異常 γ 鎖由来の断片と判断され, 異常 γ 鎖ではカルシウムによる Plm からの保護作用が欠如していたことを示している.

面白いことにこれら 2 つの異常分子では D 領域内の高親和性カルシウム結合部位 (Kd: μ M オーダー) は障害されていないが, 低親和性カルシウム結合部位 (Kd: mM オーダー) は正常で, このためカルシウム非存在下の Fbn・モノマーの重合は極度に不良ながら, mM オーダーのカルシウム存在下には完全に正常化している. このことはまた, mM オーダーのカルシウム存在下に形成される γ 鎖依存性の D 領域の高次構造が Fbn の重合に必要であること, そしてこれら 2 つの異常分子で同定された点変異部を含む γ -337 $\sim$ 375 位のペプチド断片はおそらくこれに直接は関係していないことを示唆している.

2) 新しい Plm 開裂部位の出現

Yoshida らが報告した Fbg Kyoto I では γ Asn-308 $\rightarrow$ Lys 置換が同定されているが²⁴⁾,

この置換 Lys 残基と次の Gly-309 との間のペプチド結合が Plm によって開裂されるだけでなく、この置換の為に γ 鎖 C 末領域は Plm によって分解され易いことが判明している。すなわち、D₁ 分画を EDTA 存在下に Plm 処理すると異常分画由来の D₂, D₃ の各分画が早期に出現するとともに、D₂→D₃ の分解に伴って放出される γ (303-356) 残基ペプチドも Plm によって γ 308-309 間で水解され、正常分子からは出現しない γ (303-308) 残基ペプチドが回収されている。

3) Plg との結合性が低下している異常分子

臨床的に反復する血栓症に罹患している患者に見い出され、機能検索から Plg, とくに Lys-Plg との結合が不良な異常分子が Fbg Dusard として報告されていたが²⁵⁾, 最近、遺伝子解析から A α Arg 554 → Cys 置換が同定された²⁶⁾。さらに、この置換 Cys 残基にアルブミンがジスルフィド結合しており、このため Fbn・モノマーの重合は著しく障害されているものである。この異常分子の A α 鎖 C 末を Plm 処理により切除するとアルブミンのほとんどは Fbg から解離するが、それでも猶、一部は D 領域に結合していることが電顕および immuno-blotting で確認されている。この成績から、おそらく A α Arg-554 → Cys 置換は Fbg 分子内のジスルフィド結合の配置を変え、本来なら分子内での結合に関与する D 領域内の Cys 残基の一部にも血清アルブミンが結合し、Fbg 全体の立体構造を障害しているものと推定されている。当初報告された Plg との結合性の低下²⁵⁾もこのようなジスルフィド結合の配置転換に基づく高次構造の障害から説明され得るが、これに関しては新しい情報は提示されていない。

おわりに

以上、今日構造異常が分子あるいは遺伝子レベルで同定されている異常 Fbg 分子での機能分析から、線溶機構に関して新しい情報が提供されているものに焦点を絞って小括した。

本稿中、とくにわれわれの教室からの報告として紹介した成績は単に教室の同僚だけでなく、内外の他の諸機関の共同研究者の熱意と努

苦に負う所が大きい。また、これらの研究を進めて来る上で公私にわたる数々の研究助成を受けた。この紙面を借りて深謝する。

文 献

- 1) Nieuwenhuizen, W., Vermond, A., Voskuilen, M., Traas, D.W. and Verheijen, J.H.: Identification of a site in fibrin(ogen) which is involved in the acceleration of plasminogen activation by tissue type plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* **748**: 86~92, 1983.
- 2) Voskuilen, M., Vermond, A., Veeneman, G.H.: Van Boom, J.H., Klasen, E.A., Zegers, N.D. and Nieuwenhuizen, W.: Fibrinogen lysine residue A α -157 plays a crucial role in the fibrin-induced acceleration of plasminogen activation, catalyzed by tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **262**: 5944~5946, 1987.
- 3) Yonekawa, O., Vermond, A. and Nieuwenhuizen, W.: Localization of a new site in fibrin(ogen), involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator (t-PA)-catalyzed activation of plasminogen. In *Fibrinogen 4. Current Basic and Clinical Aspects*. Matsuda, M., Iwanaga, S., Takada, A. and Henschen, A. eds., Excerpta Medica, Amsterdam. 1990, pp. 111~116.
- 4) Schielen, W.J.G., Voskuilen, M., Tesser, G.I. and Nieuwenhuizen, W.: The sequence A α -(148-160) in fibrin, but not in fibrinogen, is accessible to monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8951~8954, 1989.
- 5) Doolittle, R.F., Bouma, III, H., Cottrell, B.A., Strong, D. and Watt, K.W.K.: The covalent structure of human fibrinogen: The Chemistry of Physiology of the Human Plasma Proteins, Bing, D.H. ed. Pergamon Press, New York, Oxford, Toronto, Sydney, Frankfurt, Paris. 1989, pp77-95.
- 6) Maekawa, H., Yamazumi, K., Muramatsu, S., Kaneko, M., Hirata, H., Takahashi, N., de Bosch, N.B., Carvajal, Z., Ojeda, A., Arocha-Piñango, C.L., and Matsuda, M.: An A α Ser-434 to N-glycosylated Asn substitution in a dysfibrinogen, fibrinogen Caracas II, characterized by

- impaired fibrin gel formation. *J. Biol. Chem.* **266**: 11575~11581, 1991.
- 7) Maekawa, H., Yamazumi, K., Muramatsu, S., Kaneko, M., Hirata, H., Takahashi, N., Arocha-Piñango, C.L., Rodriguez, S., Nagy, H., Perez-Requejo, J.L. and Matsuda, M.: Fibrinogen Lima: a homozygous dysfibrinogen with an A α -arginine-141 to serine substitution associated with extra N-glycosylation at A α -asparagine-139. *J. Clin. Invest.* **90**: 67~76, 1992.
 - 8) Townsend, R.R., Hilliker, E., Li, Y.-T., Laine, R. A., Bell, W.R. and Lee, Y.C.: Carbohydrate structure of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **257**: 9704~9710, 1982.
 - 9) Suenson, E., Bjerrum, P., Holm, A., Lind, B., Meldal, M., Selmer, J. and Petersen, L.C.: The role of fragment X polymers in the fibrin enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasmin formation. *J. Biol. Chem.* **265**: 22228~22237, 1990.
 - 10) Weisel, J.W., Stauffacher, C.V., Bullitt, E. and Cohen, C.: A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* **230**: 1388~1391, 1985.
 - 11) Yamazumi K, Shimura K, Terukina S, Takahashi N, and 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**: 1590~1597, 1989.
 - 12) Terukina, S., Yamazumi, K., Okamoto, K., Yamashita, H., Ito, Y. and Matsuda, M.: Fibrinogen Kyoto III: a congenital dysfibrinogen with a γ aspartic acid-330 to tyrosine substitution manifesting impaired fibrin monomer polymerization. *Blood* **74**: 2681~2687, 1989.
 - 13) Koopman, J., Haverkate, F., Grimbergen, J., Engesser, L., Novakova, I., Kerst, A.F.J.A. and Lord, S.T.: Abnormal fibrinogens Iimuiden (B β Arg 14→Cys) and Nijmegen (B β Arg 44→Cys) form disulfide-linked fibrinogen-albumin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3478~3482, 1992.
 - 14) Engesser, L., Koopman, J., de Munk, G., Haverkate, F., Novakova, I., Verheijen, J.H., Briet, E. and Brommer, J.P.: Fibrinogen Nijmegen: congenital dysfibrinogenemia associated with impaired t-PA mediated plasminogen activation and decreased binding of t-PA. *Thromb. Haemostas.* **60**: 113~120, 1988.
 - 15) Marguerie, G., Edington, T.S. and Plow, E.P.: The binding of calcium to bovine fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta* **490**: 94~103, 1977.
 - 16) Van Ruijven-Vermeer, A.M., Nieuwenhuizen, W. and Nooijen, W.J.: Ca binding of rat fibrinogen and fibrin(ogen) degradation products. *FEBS Lett.* **93**: 177~180, 1978.
 - 17) Lindsey, G.G., Brown, G. and Purves, L.R.: Calcium binding to human fibrinogen-localization of two calcium specific sites. *Thromb. Res.* **13**: 345~350, 1978.
 - 18) Haverkate, F. and Timan, G.: Protective effect of calcium in the plasmin degradation of fibrinogen and fibrin fragments D. *Thromb. Res.* **10**: 803~812, 1977.
 - 19) Dang, C.V., Ebert, R.F. and Bell, W.R.: Localization of a fibrinogen calcium binding site between γ -subunit positions 311 and 336 by terbium fluorescence. *J. Biol. Chem.* **260**: 9713~9719, 1985.
 - 20) Nieuwenhuizen, W., Vermond, A. and Hermans, J.: Evidence for the localization of a calcium-binding site in the amino-terminal disulphide knot of fibrin(ogen). *Thromb. Res.* **31**: 81~86, 1983.
 - 21) Koopman, J., Haverkate, F., Briet, E. and Lord, S.T.: 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**: 13456~123461, 1991.
 - 22) Yoshida, N., Hirata, H., Morigami, Y., Imaoka, S., Matsuda, M., Yamazumi, K. and Asakura, S.: Characterization of an abnormal fibrinogen Osaka V with the replacement of γ -arginine 375 by glycine. *J. Biol. Chem.* **267**: 2753~2759, 1992.
 - 23) Steinman, C., Lammle, B., Heineman, G., Wer-muth, B. and Furlan, M.: Fibrinogen Bern I: Substitution γ 337 Asn→Lys is responsible for defective fibrin monomer polymerization and impaired interaction with Ca²⁺. The XIth Inter-

- national Fibrinogen Workshop, Oslo, Norway, June, 1992 (Abstr.).
- 24) Yoshida, N., Terukina, S., Okuma, M., Moroi, M., Aoki, N. and Matsuda, M.: Characterization of an apparently lower molecular weight γ -chain variant in fibrinogen Kyoto I. The replacement of γ -asparagine 308 by lysine which causes accelerated cleavage of fragment D₁ by plasmin and the generation of a new plasmin cleavage site. *J. Biol. Chem.* **263**: 13848~13856, 1988.
- 25) Soria, J., Soria, C. and Caen, J.P.: A new type of congenital dysfibrinogenemia with defective fibrin lysis—Dusard syndrome: possible relation to thrombosis. *Brit. J. Haematol.* **53**: 575~586, 1983.
- 26) Siebenlist, K.R., Mosesson, M.W., Diorio, J.P., Soria, J., Soria, C. and Caen, J.P.: The polymerization of fibrinogen Dusard (A α 554 Arg→Cys) after removal of carboxy terminal regions of the A α chains. The XIth International Fibrinogen Workshop, Oslo, June, 1992 (Abstr.).
-