◆総説◆

合成ペプチドを応用したフィブリン重合機転の解析

山 角 健 介* 田 辺 元* 愛 甲 孝*

Analysis of Fibrin Monomer Polymerization by Synthetic Peptides

Kensuke YAMAZUMI*, Gen TANABE* and Takashi AIKOU*

Key words: fibrinogen, fibrin polymerization, synthetic peptide, photoaffinity labeling

はじめに

フィブリノゲン (Fbg) は生理的・病的血拴や創傷治癒局所でのフィブリン (Fbn)・マトリックスの主たる基材として重要な役割を演じ、構造的には3種類のポリペプチド鎖, $A\alpha$, $B\beta$, γ がジスルフィド結合 (S-S 結合) して作られる分子半量体がそのアミノ基末 (N 末) で S-S 結合した $(A\alpha-B\beta-\gamma)_2$ として血中に存在している¹⁾。血液凝固最終段階における Fbn ゲル化反応の過程として、

1. トロンビン (Thr) の Fbg 結合および限定分解によるフィブリノペプチド A, B (FPA, FPB) の切断・放出, Fbn モノマー (FM) の形成
2. 二本鎖原線維 (two-stranded fibrin protofibril) の形成
3. 二本鎖原線維間の側々結合 (lateral association)
4. 活性型凝固第 XIII 因子 (XIIIa) による分子間架橋結合 (γ -dimer, α -polymer) が挙げられる^{1)~4)}。

他の血漿蛋白の多くでは結晶作成・解析が行われているが, Fbg に関しては未だ成功せず, Fbn 重合反応における結合部位そのものは分子レベルにおいて同定されていない状況であ

る。現状では Fbn 重合の結合部位を推測する strategy としてアミノ酸配列あるいは電顕レベルでの解析や先天性異常分子, 合成ペプチドを用いたものが中心となっている^{1)~7)}。

本稿では Thr により FPA, FPB が切断・放出された後に露呈される重合反応基およびそれらに対する相補的結合部位に関して, 特に合成ペプチドを用いた検討を中心に総括する。

FPA 放出後に露呈される重合反応基 'A'

Thr は Fbg $A\alpha$ 鎖 N 末端の 16 個のポリペプチド鎖である FPA を切断・放出し, その結果, α 鎖 N 末は Gly-Pro-Arg に始まるアミノ酸配列 ($A\alpha$ 鎖 17-19 位に相当) を示す。この α 鎖 N 末三残基のアミノ酸配列は Lamprey に至るほかの脊椎動物においても同様に認められ, 重要な意味を持つ (表 1)。事実, Doolittle らのグループは平衡透析を用い, 合成ペプチド Gly-Pro-Arg 型は Fbg およびプラスミン (Pln) 分解産物 D1 と各々 2, 1 のモル比で結合するが, D3 とは結合しないと報告した^{8)~11)}。さらに, このペプチドを加えることにより Fbg のトロンビン時間が延長することも見出した (表 2)。また, Diaminodipropylamine セファローズに合成ペプチド Gly-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Glu を結合させたカラムを用いると Fbg-Pln 分解産

* 鹿児島大学医学部第一外科 [〒 890 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1]: First Department of Surgery, Kagoshima University School of Medicine, Sakuragaoka 8-35-1, Kagoshima 890, Japan

Table 1 Amino Acid Sequences at the Amino-Termini of Fibrin A α - and B β -Chains from Various Species

			1	2	3	4	5	6	7
			↓						
Human	A α -chain	-Arg	Gly	-Pro	-Arg	-Val	-Val	-Glu	-Arg-
Bovine	A α -chain	-Arg	Gly	-Pro	-Arg	-Leu	-Val	-Glu	-Lys-
Dog	A α -chain	-Arg	Gly	-Pro	-Arg	-Ile	-Val	-Glu	-Arg-
Chicken	A α -chain	-Arg	Gly	-Pro	-Arg	-Ile	-Leu	-Glu	-Asn-
Lamprey	A α -chain	-Arg	Gly	-Pro	-Arg	-Leu	-Thr	-Glu	-Gln-
Human	B β -chain	-Arg	Gly	-His	-Arg	-Pro	-Leu	-Asp	-Lys-
Bovine	B β -chain	-Arg	Gly	-His	-Arg	-Pro	-Tyr	-Asp	-Lys-
Dog	B β -chain	-Arg	Gly	-His	-Arg	-Pro	-Leu	-Asp	-Lys-
Chicken	B β -chain	-Arg	Ala	-His	-Arg	-Pro	-Leu	-Asp	-Lys-
Lamprey	B β -chain	-Arg	Gly	-Val	-Arg	-Pro	-Leu	-Pro	-Ser-

Table 2 Inhibition of Clotting by Gly-His-Arg-Pro and Gly-Pro-Arg-Pro¹¹⁾

Peptides	Thrombin/Fibrinogen Clotting Time (Seconds)	
	2 mM CaCl ₂ Present	CaCl ₂ Absent
Control	13	20
Gly-His-Arg-Pro (10 mM)	15	18
Gly-Pro-Arg-Pro (1 mM)	49	180
Gly-Pro-Arg-Pro (1 mM) + Gly-His-Arg-Pro (10 mM)	113	200

Final conditions: Human fibrinogen = 10^{-5} M, Thrombin = 5 units/ml,
0.15 M NaCl, 0.05 M Imidazole, pH = 7.2. Temperature = 22°C.

物より大量の D1 を精製することが可能となった¹²⁾¹³⁾。

以上のことより、FPA 放出後に露呈される Gly-Pro-Arg ペプチド断端は Fbn 重合反応基 'A' site としての役割を有すると同時に、それに対する相補的結合部位 'a' site を形成する高次構造においては D1 → D3 へと Pln 分解される際に放出される γ 鎖 303 位 Phe よりカルボキシル基末 (C 末) が重要であると想定された。この結合においては、'A' site に存在している陽性荷電の A α 鎖 17 位 Gly アミノ基および A α 鎖 19 位 Arg グアニジノ基が同一側面に配置された Knob を形成し、Glu や Asp に供給される陰性荷電を有する hole, 'a' site と結合する二又ソケット説が有力である¹⁾。さらに、これらを裏づける事実として、A α 鎖 17-19 位、あるいは γ 鎖 C 末に構造異常をもつ先天性異常 Fbg 分子ではいずれも Fbn 重合障害が認められている⁶⁾。

また、合成ペプチド Gly-Pro-Arg 型は Fbn

重合機転に重要な役割を果たすだけでなく、Fbg-Pln 分解において新たな機能を有することが判明した¹⁴⁾。通常、Ca²⁺ 存在下では Fbg-Pln 分解すると D1 および E 分画を生じるが、EGTA 存在下ではさらに D1 から D2, D3 へと γ 鎖 C 末が限定分解されることより、Ca²⁺ 依存性の立体構造が Pln 抵抗性を有するものと考えられる。 γ 鎖 C 末の高親和性 Ca²⁺ 結合部位は γ 鎖 303-355/356 位あるいは 311-316 位に存在し、Pln 分解に関与することが既に報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、EGTA 存在下で Gly-Pro-Arg-Pro amide を加えて Fbg-あるいは D1-Pln 分解しても D2, D3 は認められず、Gly-Pro-Arg ペプチドは Ca²⁺ と同様に Pln 抵抗性の立体構造を形成するものと考えられる (図 1)。以上のことより、 γ 鎖 C 末の高親和性 Ca²⁺ 結合部位と重合反応基に対する相補的結合部位 'a' site は非常に近接し、この両者を構成する Asp や Glu の側鎖が一部共有されている可能性もある。これを裏づける事実として、 γ 鎖 C 末の高

Fig. 1 SDS-PAGE of human fibrinogen (A) or fragment D1 (B) digested with plasmin for 12 h under various conditions¹⁴⁾.

All the digests were carried out in 0.05 M imidazole, pH 7.5, containing 0.15 M NaCl at 22°C.

Upper panels, non-reduced samples; lower panels, reduced samples. Lane 1, native fibrinogen; lanes 2 and 7, 5 mM CaCl_2 ; lanes 3 and 8, 0.5 mM EGTA; lanes 4 and 9, 0.5 mM EGTA and 5 mM Gly-His-Arg-Pro amide; lanes 5 and 10, 0.5 mM EGTA and 5 mM Gly-Pro-Arg-Pro amide; lane 6, native Fragment D1. The three different forms of fragment D and their three corresponding γ -chains are designated by horizontal lines.

親和性 Ca^{2+} 結合部位の欠如と Fbn 重合障害を有する異常分子が同定されている⁶⁾¹⁷⁾.

また、丹羽らはこれらに加えて Gly-Pro-Arg 存在下では tissue-type plasminogen activator (t-PA) 結合も抑制されることを見出し、'a' site と γ 鎖 C 末に存在する t-PA 結合部位とは近接すると報告している¹⁸⁾¹⁹⁾.

photoaffinity label を応用した 'a' site の解析

前述したことを踏まえ、筆者らは Doolittle の下で nitrophenyl azido を用いた photolabel を行い、Fbn 重合反応基 'A' に対する相補的結合部位 'a' site を検討した¹²⁾¹³⁾. 主に合成ペ

チド [^{14}C] Gly-Pro-Arg-N (4-azido-2-nitrophenyl) Lys amide (PA ペプチド) と D1 を用いた. この解析において重要なこととして

1. PA ペプチドの特異性が合成ペプチド Gly-Pro-Arg 型と同一であること (特に結合部位)

2. photolabel の条件 (緩衝液, irradiation, 温度など)

3. photolabel の評価

などが挙げられ、これらに対して種々の基礎実験が行われた.

まず、平衡透析から PA ペプチドは Fbg および D1 とそれぞれ 2, 1 のモル比にて結合し、さらに cold Gly-Pro-Arg-Pro 存在下での結合は

Table 3 Incorporation of Label in Fragment D1 in Presence and Absence of Cold Gly-Pro-Arg-Pro amide and Influence of Tris Buffer

Buffer	TBS	TBS	NB	NB	★ NB	★ NB
Fragment D1	33 uM	33 uM	33 uM	33 uM	33 uM	33 uM
Gly-Pro-Arg-N-nitrophenylazido-Lys amide	0.33 mM	0.33 mM	0.33 mM	0.33 mM	0.33 mM	0.33 mM
Gly-Pro-Arg-Pro amide (cold)	6.6 mM	0	6.6 mM	0	6.6 mM	0
(Label) peptide/D1 (moles/mole)	0.08	0.26	0.10	0.61	0.01	0.02

★ In these experiments, the Gly-Pro-Arg-nitrophenylazido-Lys amide was irradiated for 30 min before the addition of fragment D1 and/or cold Gly-Pro-Arg-Pro amide in the dark.

TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl and CaCl₂

NB: 0.51 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4

著明に抑制されることが明らかになった (表 3)。次に、緩衝液の種類や適切な irradiation も検討され、トリスあるいはイミダゾール緩衝液を用いると photolysis が抑制されたり、非特異的 label が増えることも判明した。そのために irradiation までは緩衝液なしの条件下で実験を行った。

また、photolysis 後に最も大切なことは PA ペプチドの aryl azido が D1 のいずれのアミノ酸に label されたかを解析することである。具体的には irradiation 後に D1 を還元カルボキシメチル化後に種々の酵素で分解し、HPLC で label されたペプチドを拾いあげた。その後、先天性異常 Fbg の解析で多大な貢献を示した lysyl endopeptidase や asparaginyl endopeptidase を用いることによって、 γ 鎖 363 位 Tyr のみ特異的に label されていることが明らかになった¹³⁾。

ここで、強調したいことは前述したように label されたことに対する評価である。図 2 は PA ペプチドの Gly アミノ基や Arg グアニジノ基が Tyr と直接結合したのではなく、nitrophenyl azido が Tyr 水酸基と反応・結合したことを示す。この両者の結合の結果、Tyr 水酸基から Gly アミノ基および Arg グアニジノ基までの距離は各々 8-12 Å, 10-17 Å と想定されることより、hole としての 'a' site は γ 鎖 363 位 Tyr から 8-17 Å 内に存在することになる。

FPB 放出後に露呈される重合反応基

in vitro では Trn による 14 個のポリペプチ

Fig. 2 Molecular model generated by computer graphics of Gly-Pro-Arg-N (4-azido-2-nitrophenyl) Lys amide attached to a tyrosine side chain.

ド鎖から成る FPB の切断・放出は FPA のそれに遅れて認められる。その結果、 β 鎖 N 末には Gly-His-Arg ($B\beta$ 15-17 位に相当) が露呈され、これら 3 残基の配列は lamprey や chicken を除く多くの脊椎動物で証明されている (表 1)。

Shainoff らは蛇毒から FPB のみ切断する酵素を分離・精製し、des BB Fbn を検討した結果、14°C 以下では Fbn のゲル化を認めるも加温により可溶化することを見出し、 $B\beta$ 鎖 N 末の Pln 限定分解により放出されるペプチド残基 ($B\beta$ 15-42 位に相当) が Fbn 重合反応基として重要であると述べている²⁰⁾。また、Doolittle

らは平衡透析を行い, 合成ペプチド Gly-His-Arg 型と Fbg, D1, D3 とは各々 2, 1, 1 のモル比で結合し, Ca^{2+} 存在下においてそれらの結合定数は高くなることを明らかにし, FPB 放出後に露呈される Gly-His-Arg ペプチド断端により形成される Fbn 重合反応基 'B' site とその相補的結合部位 'b' site の存在を報告した^{8)~11)}. しかし, Gly-His-Arg-Pro 単独では Fbg-トロンビン時間に影響は及ぼさず, Fbn 重合も阻害しないが, 不思議なことに, これと Gly-Pro-Arg の両者を加えたトロンビン時間は Gly-Pro-Arg を単独に加えた系よりも著明に延長する(表 2). 一方, 合成ペプチド Gly-His-Arg 型は 10 μM の Ca^{2+} 濃度では Fbg-トロンビン凝集を促進し, 1 mM の濃度では抑制するとの報告や Fbn 重合曲線の立ち上がりを促進するが最大吸光度に関しては阻害する, あるいは B β 鎖 15-42 位のペプチド残基は Gly-His-Arg-Pro より Fbn 重合を強く阻害するとの発表がある¹⁸⁾²¹⁾²²⁾. また, Gly-His-Arg ペプチドの特異的結合部位は α 鎖 C 末に存在するとの結果もある²³⁾.

以上のように, 合成ペプチドを用いた解析の結果は様々であり, FPB 放出後に露呈される重合反応基の複雑性を意味する. この原因の一つとして, B β 鎖 16 位 His イミダゾール基(pKa: 6.0)が挙げられる. FPB 放出後に露呈される Gly-His-Arg ペプチド断端 'B' site では 'A' site と同様に B β 鎖 15 位 Gly アミノ基および 17 位 Arg グアニジノ基の陽性荷電を中心に Knob を形成すると思われるが, *in vitro* では pH の条件によるイミダゾール基の荷電状況を考慮する必要がある.

合成ペプチド Gly-His-Arg 型と D1 との結合

[^{14}C]Gly-His-Arg-Pro-N (4-azido-2-nitro-phenyl) Lys amide と D1 を用いて photolabel を行うと β /D1 鎖に 80%, γ /D1 鎖に 20% が取り込まれ, cold Gly-His-Arg-Pro 存在下でこの反応は著明に抑制された. しかも, cold Gly-Pro-Arg 存在下においては β /D1 鎖にのみ label された. このように合成ペプチド Gly-His-Arg 型は潜在的に γ /D1 鎖に存在する 'a'

site にも結合する. 事実, EGTA および Gly-His-Arg-Pro 存在下に Fbg-, あるいは D1-Pln 分解をおこなうと若干ではあるが, D1 $\rightarrow$ D2, D3 の形成は遅延した(図 2). 一方, β /D1 鎖内の photolabel されたアミノ酸を最終的に同定することはできなかった. その理由のひとつとして, label されたペプチドと D1 とのモル比が 0.15 と低く, 'b' site 近傍に Tyr 水酸基のような求核性側鎖が存在しないことが考えられる.

'B' site に対する相補的結合部位 'b' site の検討において, 興味深い結果がある. D1 sepharose カラムを作り [^{14}C]Gly-His-Arg-Pro amide との結合実験を行った(図 3). その結果, 22°C では両者の結合に対する Ca^{2+} の最大効果は 0.5 mM で認められ, 4°C では 0.05 mM であった. しかし, 同じ 2 価イオンである Mg^{2+} では 0.5 mM の濃度, 22°C の条件下でも両者の結合に対して同様の効果はみられなかった. また, これらを裏づけるために Gly-His-Arg-Pro-Gly-Gly-Glu sepharose カラムを用いて D1 との結合をみた. 図 5 に示すように, 4°C, Ca^{2+} 5 mM 存在下において両者の結合は全くみられなかったが, 22°C, Ca^{2+} 0.1 mM の条件下では溶出分画に D1 が認められた. 以上より, Ca^{2+} 濃度依存性に 'B' 'b' 間の結合能は高くなるため, 'b' site は Ca^{2+} 結合部位の近傍に存在することが示唆され, また, 温度はアミノ酸や蛋白の疎水性において関連があり, 両者の結合に影響を与えるものと考えられる. しかし, 「何故, 22°C 0.1 mM 以上あるいは 4°C 0.05 mM 以上の条件下においては Ca^{2+} 濃度依存性に結合能の低下が認められるのか?」という疑問が生じてくる. Weis らによる mannose-binding protein の結晶解析において, Ca^{2+} 結合部位 2 カ所はともに S-S 結合と近接する loop で形成される範囲に存在し, しかも一部のアミノ酸側鎖を共有している²⁴⁾(図 5). また, β /D1 鎖, γ /D1 鎖の C 末には mannose-binding protein の Ca^{2+} 結合部位と相同性のあるアミノ酸配列が認められ²⁵⁾, さらに β /D1 鎖 C 末には少なくとも高親和性 Ca^{2+} 結合部位はみられない. 以上のことより, β /D1 鎖 C 末に低~中親和性 Ca^{2+} 結合部位が 2 カ所あり, その近傍に 'b' site が

Fig. 3 Binding of [¹⁴C] Gly-His-Arg-Pro amide to a fragment D1 sepharose column.

Fifty nm of [¹⁴C] Gly-His-Arg-Pro amide in 330 μl of 0.05 M imidazole, pH 7.5 containing 0.15 M NaCl was applied onto a 1.8-ml column. After being eluted with 0.05 M NaAc, pH 5.3 containing 1 M NaBr, the eluted fractions were examined for the radioactivity. The specific activity of the synthetic peptides averaged 24 cpm/nm.

Fig. 4 Chromatography of fragment D1 on a Gly-His-Arg-Pro-Gly-Gly-Glu sepharose column.

5 mg of fragment D1 in 300 μl of 0.05 M imidazole, pH 7.5 containing 0.15 M NaCl was applied onto a 2-ml column in the presence of 5 mM CaCl₂ at 4°C (●) or in the presence of 0.1 mM CaCl₂ at 22°C (○). After washing the column, elution with 0.05 M NaAc pH 5.3, containing 1 M NaBr was started at the position indicated by the arrow.

存在すると仮定すれば、Ca²⁺濃度依存性による結合能上昇および低下を説明できると考えている。

おわりに

以上、本稿では合成ペプチドを応用した Fbn 重合機転の解析に関して、筆者らの結果を含め

て解説した。特に、Fbn 重合の初期にみられる D・E contact—FPA 放出後に露呈される ‘A’ site と ‘a’ site との結合—に関してはその特異性が明らかになりつつある。しかし、先天性異常分子を用いた検討から二本鎖原線維形成には D・E contact だけでは不十分で、D・D self association—E 領域と結合した隣接する二分

Fig. 5 Schematic representation of calcium-binding regions of mannose-binding protein (MBP-A) and human fibrinogen γ chain (FGAH)²⁵⁾.

An X-ray structure of MBP-A has revealed those residues providing ligands for two bound calcium atoms; solid diamonds denote ligands for calcium-site 1 and solid circles for calcium-site 2 (data from Weiss et al.)²⁴⁾. In the case of FGAA, asterisks denote residues known to be changed or deleted in human variant fibrinogens that exhibit defective calcium binding (data from Matsuda et al.)⁶⁾.

子の D 領域間での結合一の重要性も指摘されている⁷⁾²⁶⁾²⁷⁾。今後、D・E contact の障害によるものと想定されていた γ 鎖 C 末に構造異常を有する異常分子と合成ペプチドを用いた 'A' site との関係を電顕レベルでの解析を含めて詳細に検討する必要がある。

一方、FPB 放出後に露呈される 'B' site に関しては未だ不明な点が多く、諸家の報告や筆者らの結果についても十分説明できない部分もある。分子量 34 万の巨大な Fbg 1 分子において、'B' site は FPA 放出後の D・E contact により少なからず制約を受け、その機能が限られることが予想される。また、重合反応基として合成ペプチド Gly-His-Arg 型を用いることが適切であるか否かの問題もあるが、現時点において、'B' site は 'A' site の機能を補う modulator としての役割や Ca^{2+} と協調して Fbn 形成を促進させる機能を有していると考えられる。

本研究の一部は文部省科学研究費（基盤研究 (c) 06671216, 07671317) の助成による。

文 献

- 1) Doolittle RF: Fibrinogen and Fibrin, in Bloom AL, Thomas DP (eds): Thrombosis and Haemostasis. 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburg, 1987, 192-215.
- 2) Blömbäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L: A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* **275**: 501-505, 1978.
- 3) Fowler WE, Hantgan RR, Hermans J, Erickson HP: Structure of the fibrin protofibril. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4872-4876, 1981.
- 4) Budzynski AZ, Olexa SA, Pandya BV: Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Ann N Y Acad Sci* **408**: 301-314, 1983.
- 5) Fowler WE, Erickson HP: Trinodular structure of fibrinogen. Conformation by both shadowing and negative stain electron microscopy. *J Mol Biol* **134**: 241-249, 1979.
- 6) Matsuda M, Yoshida N, Terukina S, Yamazumi K, Maekawa H: Molecular abnormalities of fibrinogen - the present status of structure elucidation.

- tion, in Matsuda M, Iwanaga S, Takada A, Henchen A (eds): Fibrinogen 4. Current Basic and Clinical Aspects. Elsevier, Amsterdam, 1990, 139-152.
- 7) Mossesson MW, Siebenlist KR, Diorio JP, Matsuda M, Hainfeld JF, Wall JS: The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II ($\gamma 275$ Arg $\rightarrow$ Cys). *J Clin Invest* **96**: 1053-1058, 1995.
 - 8) Laudano AP, Doolittle RF: Synthetic peptides derivatives which bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 3085-3089, 1978.
 - 9) Laudano AP, Doolittle RF: Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, numbers of binding sites and species differences. *Biochemistry* **19**: 1013-1019, 1980.
 - 10) Laudano AP, Doolittle RF: Influence of calcium ion on the binding of fibrin amino-terminal peptides to fibrinogen. *Science* **212**: 457-459, 1981.
 - 11) Laudano AP, Cottrel BA, Doolittle RF: Synthetic peptides modeled on fibrin polymerization sites. *Ann N Y Acad Sci* **408**: 315-329, 1983.
 - 12) Shimizu A, Nagel G, Doolittle RF: Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site. Isolation and characterization of a labeled cyanogen bromide fragment corresponding to γ chain residues 337-379. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2888-2892, 1992.
 - 13) Yamazumi K, Doolittle RF: Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site. Localization of the label to tyrosine $\gamma 363$. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2893-2896, 1992.
 - 14) Yamazumi K, Doolittle RF: The synthetic peptide Gly-Pro-Arg-Pro-amide limits the plasmin digestion of fibrinogen in the same fashion as calcium ion. *Protein Sci* **1**: 1719-1720, 1992.
 - 15) Dang CV, Ebert RF, Bell WR: Localization of a fibrinogen calcium binding site between γ -subunit positions 311 and 336 by terbium fluorescence. *J Biol Chem* **260**: 9713-9717, 1985.
 - 16) Varadi A, Scheraga A: Localization of segments essential for polymerization and for calcium binding in the γ -chain of human fibrinogen. *Biochemistry* **25**: 519-528, 1986.
 - 17) 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**: 13456-13461, 1991.
 - 18) 丹羽和紀, 朝倉伸司, 竹部幹浩, 諏合輝子, 三室淳, 坂田洋一, 松田道生, 山角健介: フィブリンのD領域内の重合反応基 “a”, “b” の局在とその機能. *日本血栓止血学会誌* **4**(補): p 333, 1993.
 - 19) Yonekawa O, Vermond A, Nieuwenhuizen W: Localization of a new site in fibrin, involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator (t-PA)-catalyzed activation of plasminogen, in Matsuda M, Iwanaga S, Takada A, Henchen A (eds): Fibrinogen 4. Current Basic and Clinical Aspects. Elsevier, Amsterdam, 1990, 111-116.
 - 20) Shainoff JR, Dardik BN: Fibrinopeptide B and aggregation of fibrinogen. *Science* **204**: 200-202, 1979.
 - 21) Pandya BV, Gabriel JL, O'Brien J, Budzynski AZ: Polymerization site in the β chain of fibrin: Mapping of the B β 1-55 sequence. *Biochemistry* **30**: 162-168, 1991.
 - 22) Furlan M, Rupp C, Beck EA: Inhibition of fibrin polymerization by fragment D is affected by calcium, Gly-Pro-Arg and Gly-His-Arg. *Biochim Biophys Acta* **742**: 25-32, 1982.
 - 23) Hasegawa N, Sasaki S: Location of the binding site “b” for lateral polymerization of fibrin. *Thromb Res* **57**: 183-195, 1990.
 - 24) Weis WI, Kahn R, Fourme R, Drickamer K, Hendrickson WA: Structure of the calcium dependent lectin domain from rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* **254**: 1608-1615, 1991.
 - 25) Doolittle RF: A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives. *Protein Sci* **1**: 1563-1577, 1992.
 - 26) 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** : 1034-1041, 1983.
- 27) 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 to impaired fibrin assembly in a homozygous dysfibrinogen Kurashiki I. Blood **87** : 4686-4694, 1996.
-