余剰糖鎖を付加された遺伝性異常フィブリノゲン

松 田 道 生*

Hereditary Dysfibrinogens Associated with Extra Oligosaccharides

Michio MATSUDA*

Key words: hereditary dysfibrinogen, extra glycosylation, glycosylation sequence, oligosaccharide, α C domain

1. フィブリノゲンの糖鎖

フィブリノゲン (fibrinogen, Fbg) は3種類のサブユニット, $A\alpha$ 鎖(610 残基), $B\beta$ 鎖(461 残基), γ 鎖(411 残基) が互いにジスルフィド結合した半分子構造が, そのアミノ基末近傍でジスルフィド結合により結びつけられたダイマー($A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂として血漿中に存在している¹⁾. また $B\beta$ 鎖及び γ 鎖にはそれぞれ1個ずつ2分岐アンテナ様構造を持つオリゴ糖 (biantennary oligosaccharide) が付加されていて²⁾, フィブリンの重合反応を調節していることが示唆されている³⁾⁴⁾. これらのオリゴ糖はいずれも Asn-X-Thr 型の糖付加配列に基いて Asn 残基 ($B\beta$ -364, γ -52) に N 結合している²⁾.

本稿では, 点変異の結果, 新たに Asn-X-Thr あるいは Asn-X-Ser という糖付加配列が生じたために Asn 残基にオリゴ糖が付与された遺伝性異常 Fbg を紹介し, これによって Fbg 分子の立体構造とフィブリンの重合反応に関して得られた所見について触れてみたい。

2. 遺伝性異常 Fbg において形成されている糖付加構造と付加された余剰糖鎖

これまでに5つの異常 Fbg 分子で点変異による新しい糖付加構造の形成と余剰糖鎖が同定されている. 正常 Fbg での糖付加構造は $B\beta$ 鎖, γ 鎖共, Asn-X-Thr 型であるが, 異常 Fbg では Asn-X-Thr 型 (Caracas II⁵⁾, Pontoise⁶⁾, Asahi⁷⁾) と Asn-X-Ser 型 (Lima⁸⁾, Niigata⁹⁾) が共に知られている. いずれの異常 Fbg に於てもこの配列を認識する糖付加酵素は同一なので, 付加されている糖鎖はすべて正常 Fbg で同定された2分岐アンテナ様構造をもつオリゴ糖²⁾と同じである. しかし, 両先端のガラクトース (galactose, Gal) 残基に結合しているシアル酸の量は異常分子毎に異なっていて, Caracas II や Lima のように2つの Gal 残基共シアル酸が結合した disialylated type を多く含むもの (図1) や正常 Fbg のそれと変わらない Niigata など, 報告例は少ないながらシアル酸含量は一様ではない。

* 自治医科大学止血血栓 [〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1]

Division of Hemostasis and Thrombosis Research, Institute of Hematology, Jichi Medical School (3311-1 Minamikawachi-Machi, Kawachi-Gun, Tochigi-Ken 329-0498, Japan)

図1 フィブリノゲンに付加されている糖鎖の不均一性（上段A～D）とこれら種々の糖鎖の正常フィブリノゲンおよび異常フィブリノゲン（Caracas II と Lima）における比率（%）

3. 余剰糖鎖の Fbg の機能に対する影響

5つの異常Fbgの中、Fbg Pontoiseについてはbiantennary oligosaccharideが付加されているという事が記載されているだけで、糖鎖そのものについての情報は提供されていない。しかし、残る4つの異常分子は著者の教室で解析したもので、これらで得られた情報を整理しながら紹介してみたい。

(1) Fbg Asahi ($\gamma\text{Met-310} \rightarrow \text{Thr}$, $\gamma\text{Asn-308}$ への糖付加⁷⁾)

余剰糖鎖構造が初めて記載された異常分子で、図1のように、正常Fbgの糖鎖と骨格をなす部分は全く一致している。しかし、この糖鎖を分析した当時はシアル酸の数の如何に関する解析はしていない。この糖鎖の付加している $\gamma\text{Asn-308}$ および点変異のある $\gamma 310$ 位(正常分子ではMet)はフィブリン・モノマーの重合に与かるDドメイン上の‘a’反応基そのものではないにしても、ごく近接する位置にあり、Met

→ Thrの点変異と分子量約3000の余剰糖鎖の付加により‘a’反応基の立体構造が強く障害されているものと考えられる。このため、‘A’-‘a’反応基セットによるフィブリン・モノマー間の結合が妨げられ、重合障害に陥っていると考えられる。これを支持する所見として、活性型第XIII因子を介して進むフィブリン γ 鎖間の架橋形成は著しく遅延しており⁷⁾¹⁰⁾、フィブリン・モノマーの重合反応系に呼応して進む組織型プラスミノゲンアクチベータ(tissue-type plasminogen activator, t-PA)によるプラスミノゲン活性化反応¹¹⁾も正常分子に比し著しく不良である。

(2) Fbg Lima ($\text{A}\alpha \text{Arg-141} \rightarrow \text{Ser}$, $\text{A}\alpha \text{Asn-139}$ への糖付加)⁸⁾

ホモ接合体の男性で見出された異常分子で、Dドメインに近接するcoiled coil領域に変異と余剰糖鎖が存在している。‘A’-‘a’反応基セットを介して進む2本鎖プロトフィブリルの形成は正常であるが、形成されたプロトフィブリル

A. Thrombin Time (sec)

	Normal	Patient
Before	16.2	32.4
After	8.4	10.2

B. Fibrin Monomer Polymerization

図2 Fbg Lima に於ける脱シアル酸処理の効果. A. トロンビン時間, B. フィブリン・モノマーの重合反応. 脱シアル酸処理前後の患者由来のフィブリン・モノマー (Pn と Pd) を正常フィブリン・モノマーのそれぞれ (Nn と Nd) と比較したもの.

相互間で進展する側々結合が障害されているものと思われる。

これを支持する所見として、フィブリン・モノマーの重合反応系共存下に t-PA によるプラスミノゲン活性化が正常に促進され、また XIIIa によるフィブリン γ 鎖間の架橋形成も正常である。また余剰糖鎖を持つ D_1 分画 ('a' 反応基を有している) の固相化フィブリン・モノマー (E ドメインに 'A' 反応基を露呈している) への結合は正常であり、また正常フィブリン・モノマーの重合反応を正常 D_1 分画と同様に濃度依存性に抑制している。糖鎖は disialylated type が 68.6% (図1) で、陰性荷電の余剰糖鎖が付加したために、プロトフィブリル同士が接近する際、電気的反撥力を生じ、

その側々結合が障害されるものと考えられる。実際、脱シアル処理により陰性荷電を取り除くとトロンビン時間は著明に短縮して正常値に接近し、フィブリン重合曲線もほぼ正常化している (図2)。

(3) Fbg Caracas II ($A\alpha$ Ser-434 $\rightarrow$ Asn とこの Asn 残基への糖付加)⁵⁾

臨床的には軽い血尿を示した女性 (ヘテロ接合体) で同定された異常分子で、 $A\alpha$ 鎖のいわゆる αC ドメインの中央部に変異と余剰糖鎖を持っている。図1に示したように、余剰糖鎖の 81.9% は disialylated type であり、局所に強い陰性荷電が付与されている。事実、免疫電気泳動はより陽極側へと動く分画が存在することを示している。この陰性荷電をもつ局所は E, D 両ドメインとは遠く離れて位置しており、'A', 'a' 両反応基に対しては全く影響を与えていない。これを支持する所見として、Fbg Lima と同様にフィブリン γ 鎖の XIIIa 因子を介した架橋形成は正常であり、フィブリン・モノマーの重合反応系の線溶促進効果にも異常はない。

Fbg Lima 同様、余剰糖鎖の持つ強い陰性荷電のために、正常に形成された2本鎖プロトフィブリル同士が接近した際に電気的反撥力を生じ、プロトフィブリル間の側々結合が障害され、フィブリン重合反応が遅延するものと考えられる。Rotary shadow 法により個々の Fbg 分子を観察すると、(αC - αC) ドメインが E ドメインから遊離し、更に αC 同士の結合も無くなって αC ドメインは大きく開いている形をとっている分子が約半数に観察される¹²⁾。これは、 αC ドメインの中央部に付与された陰性荷電の為に、 αC ドメインがフィブリノペプチド A, B (FPA, FPB) の陰性荷電と反撥し合って E ドメインから遊離すると共に、両側の αC ドメイン同士間でも反撥し合う結果、 αC ドメインが大きく開環した形になっているのであろう (図3)。実際、電顕でフィブリン線維 (negatively contrasted) を観察すると、プロトフィブリルと思われる線維がきわめて疎に並んでいて、プ

図 3 ヘテロ接合体である Fbg Caracas II 分子の電顕像 (Rotary shadow 法, 共同研究者 John Weisel 教授による. 詳細については文献 12 を参照されたい). α C ドメインが E ドメインから離れた異常分子が散見される。これらを枠外にスケッチして示した。

図 4 Caracas II Fbn 束の電顕像 (Negatively contrasted. John Weisel 教授による) プロトフィブリル相互間の結合は疎で、あたかもさばき筆のように見える (上段)。しかし、22.5 nM の縞状の模様は観察される (下段)。

図 5 Caracas II Fbn 網の電顕像 (Scanning 法, John Weisel 教授による). 対照の正常 Fbn 網と比較すると, Ca⁺⁺の存在に拘らず Caracas II Fbn 網では線維の形成が不規則で, 太さも一様でない. 特徴的な所見は大きな洞状の構造があることで, その壁面の処々に Fbn 線維の終末端を見ることが出来る.

A. Thrombin Time (sec)

	Normal	Patient
Before	16.2	97.4
After	8.4	8.5

B. Fibrin Monomer Polymerization

図 6 Fbg Caracas II に於ける脱シアル酸処理の効果. A. トロンビン時間, B. フィブリン・モノマーの重合反応 (Pn, Pd, Nn, Nd については図 2 参照).

ロトフィブリル間の密着性が悪いことを示唆している (図 4). またスキャン電顕像でも, 規則正しい, 正常フィブリンに見られたようなほぼ均等の太さをもつフィブリン線維網はみられず, 不規則に集合したフィブリン線維が大きな空洞様の構築を作り, その壁には到る所にフィブリン線維の終末端 (fibrin ends) が露出している (図 5)¹²⁾. このことは, フィブリン線維の終末端では, 主として正常分子から成るフィブリン線維端に異常分子が遅れて重合し, 恰も異常分子という帽子をかぶせた様になり, それ以上長い線維の形成を障害しているとも考えられる (capping effect). しかし, 余剰糖鎖の強い陰性荷電が主としてプロトフィブリルの側々結合を障害し, このためフィブリンの重合が遅れたことは確かのものであり, 実際, 脱シアル酸処理して陰性荷電を持つシアル酸のみを除去してやると, 著明に延長していたトロンビン時間と遅延したフィブリン重合曲線は共に完全に正常化した (図 6).

(4) Fbg Niigata (B β Asn-160 $\rightarrow$ Ser, B β Asn-158 への糖付加)⁹⁾

Coiled coil regionに同定されたB β 鎖の変異分子である。Fbg LimaやCaracas IIと異なり、シアル酸含量は正常分子とほぼ同様である。グリコペプチターゼ処理により糖鎖を除去するとトロンビン時間は却って延長しており、目下、その分子機作を検討中である(未発表データ)。

4. まとめ

余剰糖鎖を有する遺伝性異常Fbgを紹介し、余剰糖鎖のもつ意味合いについて考えてみた。Fbg Caracas IIではFbg分子を電顕学的に観察することによりA α 鎖の立体的配置とフィブリンプロトフィブリルの側々結合に関して貴重な情報を得ることが出来たと考えている。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金06404043, 08407034, 文部省国際学術研究06044196, 09044329, および内藤医学研究振興財団の助成金によった。

文 献

- 1) Doolittle RF, Bouma III H, Cottrell BA, Strong D, Watt KWK: The covalent structure of human fibrinogen. In Bing DH (ed): The Chemistry and Physiology of the Human Plasma Proteins. New York, Pergamon Press, 1989, 77-95.
- 2) Townsend RR, Hilliker RE, Li Y-T, Laine RA, Bell WR, Lee YC: Carbohydrate structure of human fibrinogen. J Biol Chem **257**: 9704-9710, 1982.
- 3) Galanakis D, Martinez J, McDevitt C, Miller F: Human fetal fibrinogen: its characteristics of delayed fibrin formation, high sialic acid and AP peptide content are more marked in pre-term than in term samples. Ann NY Acad Sci **408**: 640-643, 1983.
- 4) Martinez J, MacDonald KA, Palascak JE: The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia as-

sociated with liver disease: distribution of sialic acid on the constituent chains. Blood **61**: 1196-1202, 1983.

- 5) Maekawa H, Yamazumi K, Muramatsu S, Kaneko M, Hirata H, Takahashi N, de Bosch NB, Carvajal Z, Ojeda A, Arocha-Piñango CL, 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.
- 6) Kaudewitz H, Henschen A, Soria J, Soria C: Fibrinogen Pontoise-a genetically abnormal fibrinogen with defective fibrin polymerization but normal fibrinopeptide release. In Lane DA, Henschen A, Jasani MK (eds): Fibrinogen, Fibrin Formation and Fibrinolysis. Berlin, Walter de Gruyter 1986, 91-96.
- 7) Yamazumi K, Shimura K, Terukina S, Takahashi N, Matsuda M: A γ -methionine to threonine substitution and consequent N-glycosylation at γ asparagine-308 identified is a congenital dysfibrinogenemia associated with posttraumatic bleeding, fibrinogen Asahi. J Clin Invest **83**: 1590-1597, 1989.
- 8) Maekawa H, Yamazumi K, Muramatsu S, Kaneko M, Hirata H, Takahashi N, Arocha-Piñango CL, Rodriguez S, Nagy H, Perez-Requejo JL, Matsuda M: Fibrinogen Lima: a homozygous dysfibrinogen with an A α -arginine-141 to serine substitution associated with extra-glycosylation at A α -asparagine-139. J Clin Invest **90**: 67-76, 1992.
- 9) Sugo T, Nakamikawa C, Yamaguchi S, Matsuda M, Takahashi N, Takahashi H, Nagai K: Fibrinogen Niigata: an abnormal fibrinogen with a B β Asn-160 to Ser substitution associated with extra glycosylation at B β Asn-158. Thromb Haemost (Suppl.) 627, 1997. (abstr.)
- 10) Matsuda M: The structure-function relationship of hereditary dysfibrinogens. Internat J Hematol **64**: 167-179, 1996.
- 11) Suenson E, Bjerrum P, Holm A, Lind B, Meldal M, Selmer J, Petersen IC: The role of fragment X polymers in the fibrin enhancement of tissue

-
- plasminogen activator-catalyzed plasmin formation. J Biol Chem **265**: 22228-22237, 1990.
- 12) Woodhead JL, Nagaswami C, Matsuda M, Arocha-Piñango CL, Weisel J : The ultrastructure of fibrinogen Caracas II molecules, fibers and clots. J Biol Chem **271**: 4946-4953, 1996.
-