

◆凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構◆

フィブリノゲンの多様性 —その構造と機能, および分子進化について—

竹尾和寛^{*1}, 中垣智弘^{*2}, 岩永貞昭^{*3}

竹尾和寛

The diversity of fibrinogen ; its structure, function and molecular evolution

Kazuhiro TAKEO^{*1}, Tomohiro NAKAGAKI^{*2}, Sadaaki IWANAGA^{*3}

2008年 熊本大学薬学部 卒業
2010年 熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程 修了
同年 化学及血清療法研究所 入所

Key words: Fibrinogen, Fibrin, α -Thrombin, Post-translational modification

1. はじめに

フィブリノゲンは, α -トロンビンによる限定分解を介して不溶性フィブリンクロットを形成し, 止血栓形成で重要な役割を果たすとともに, 種々の細胞とも相互作用する. その血漿濃度は2.5~3.0mg/mL (約9 μ M)であり, これはアルブミン, IgG, リポ蛋白質, ハプトグロビンに次いで5番目に高く, 全血漿蛋白の約5%を占める. 肝実質細胞で合成・分泌され1日当たりの産生量は約2グラムで, 血中に80%, 組織液中に20%の割合で存在し, 血漿中での半減期は3~4日と言われている.

本稿では, 最近の報告を基に, i) フィブリノゲンの分子構造, ii) フィブリンネットワーク形成とフィブリンの架橋反応, iii) フィブリンへのトロンビン結合性とその抗トロンビン作用, iv) フィブリノゲンおよびフィブリンに親和性を示す蛋白質, v) 翻訳後修飾およびその病態との関連, vi) フィブリン接着剤 (フィブリノゲンの臨床応用の1つとして), vii) フィブリノゲンの分子進化について概説する. なお, フィブリノゲ

ンおよびその周辺に関するレビューは, 過去にも幾度か本誌等で取り挙げられている^{1)~5)}.

2. ヒトフィブリノゲンの分子構造

フィブリノゲンは, 質量数67kDaのA α 鎖(610残基), 56kDaのB β 鎖(461残基)および47.5kDaの γ 鎖(411残基)の3種のポリペプチド鎖からなり, それらが29個のジスルフィド結合により連結し, 340kDaのホモダイマー, (A α -B β - γ)₂を形成している^{*1}. 電子顕微鏡による観察などからフィブリノゲンは, 図1-A⁶⁾に示すように, 外側に位置する2つのD領域, 中央に位置する1つのE領域, および2つの α C領域からなる. 外側に位置するDや α Cのペアは, 三重螺旋構造のコイルドコイルセグメントを介して中央のE領域に連結し, 全長45nmの細長い構造を示す. E領域は, 各鎖のアミノ(N)末端のジスルフィド結合によって球状に近い構造を形成し, 一方, D領域は主にB β 鎖と γ 鎖からなり, そのカルボキシル(C)末端側でのジスルフィド結合により球状様の構造をとる. また, α Cは

*1 一般財団法人化学及血清療法研究所蛋白製剤研究部 [〒860-8568 熊本市北区大窪1-6-1]

Therapeutic Protein Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto 860-8568, Japan]

Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234 e-mail: takeo-kaz@kaketsuken.or.jp

*2 一般財団法人化学及血清療法研究所監事

*3 一般財団法人化学及血清療法研究所顧問

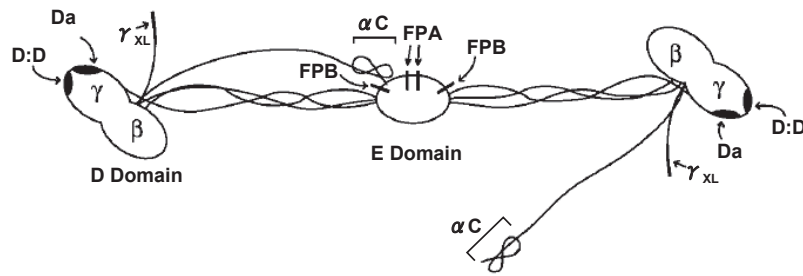


図 1-A フィブリノゲン分子の構造

(Mosesson MW, J Clin Invest. 1996; 97: 2342-2350. Fig.1 を参考に作成)

フィブリノゲンは、質量数 67kDa の A α 鎖 (610 残基), 56kDa の B β 鎖 (461 残基) および 47.5kDa の γ 鎖 (411 残基) の 3 種のポリペプチド鎖からなる。それらが 29 個のジスルフィド結合により連結し, 340kDa のホモダイマー, (A α -B β - γ)₂ を形成しており, 外側の 2 つの D 領域, 中央の E 領域, および 2 つの α C 領域からなる。外側に位置する D や α C のペアは, 三重螺旋構造のコイルドコイルセグメントを介して中央の E 領域に連結し, 全長 45nm の細長い構造を示す。E 領域は, 各鎖の N 末端のジスルフィド結合によって球状に近い構造を形成し, 一方, D 領域は主に B β 鎖と γ 鎖からなり, その C 末端側でのジスルフィド結合により球状様の構造をとる。また, α C は A α 鎖の C 末端部分からなり, 相互作用部位を形成するように中央の E 領域に折り畳まれている。

A α 鎖の C 末端部分からなり, 相互作用部位を形成するように中央の E 領域に折り畳まれている。プラスミンは主に棒状のコイルドコイルセグメントを分解するため, XIIIa 因子によって架橋されたフィブリンがプラスミン分解を受けると, D ダイマーと E 画分が検出される。

フィブリノゲンにはこの基本構造に加え, γ 鎖にはバリエーションである γ' が存在する。これは, alternative splicing により γ 鎖の C 末端 407 残基に続いてさらに 20 残基のアミノ酸が付加しており, 2 個の硫酸化チロシンを含む。産生されるフィブリノゲンの約 8% が γ' を含むが, その大部分は, ヘテロダイマー (γ'/γ) として存在し, ホモダイマー (γ'/γ') は 1% 以下である⁷⁾。

フィブリノゲンは α -トロンピンにより限定分解を受けてフィブリンに変換されるが, その際フィブリノペプチド A (FpA) および B (FpB) という 2 種類のペプチドが遊離する。それぞれは A α 鎖および B β 鎖の N 末端に位置し, 16 残基および 14 残基からなる。通常のいわゆる溶液中の反応では, 最初に FpA が, 次に FpB が遅れて遊離し, フィブリンに変換される⁸⁾。一方, 血管障害部位などに吸着した「固相上」というべき場でのフィブリノゲンは, そのコンフォメーションを変化させ, 種々の細胞や凝固因子との相互作用において有意な役割を果たすだけでなく⁹⁾, 溶液中のフィブリノゲンとは異なり FpB 遊離の遅

延無しにフィブリンに変換される。この固相上への吸着は, 低濃度の場合 “side-on” に (フィブリノゲン分子が固相上に横たわるように), 高濃度の場合には “end-on” に (フィブリノゲン分子が固相上に立つように) に吸着するが¹⁰⁾, “end-on” に吸着したフィブリノゲンやフィブリンに吸着したフィブリノゲンがフィブリンに変換されるとき FpB 遊離の量は, FpA 量よりずっと多いという。FpB が強力な走化性を示すことから, 傷害部位へ細胞を引き寄せるなど, 生理的な意義があると考察されている¹¹⁾。

3. フィブリンネットワークの形成¹²⁾ と架橋反応

フィブリン形成は, α -トロンピン切断により E ドメイン内の E_A (ノブ A ともいう) と呼ばれる重合化部位を露出させることにより開始される。トロンピンによる A α 鎖の Arg16-Gly17 結合の切断により新しい N 末端として露呈する Gly-Pro-Arg-Val が E_A として機能し, 近接する別のフィブリン分子 D ドメイン内の γ 鎖 337-379 に位置する binding pocket (Da, γ hole, あるいは hole a という) と相互作用する。この E_A: Da (middle-to-end) 会合により, E と D の両ドメインが交互に重なり合うように配列し, 二重鎖のプロトフィブリンを形成する。Gly-Pro-

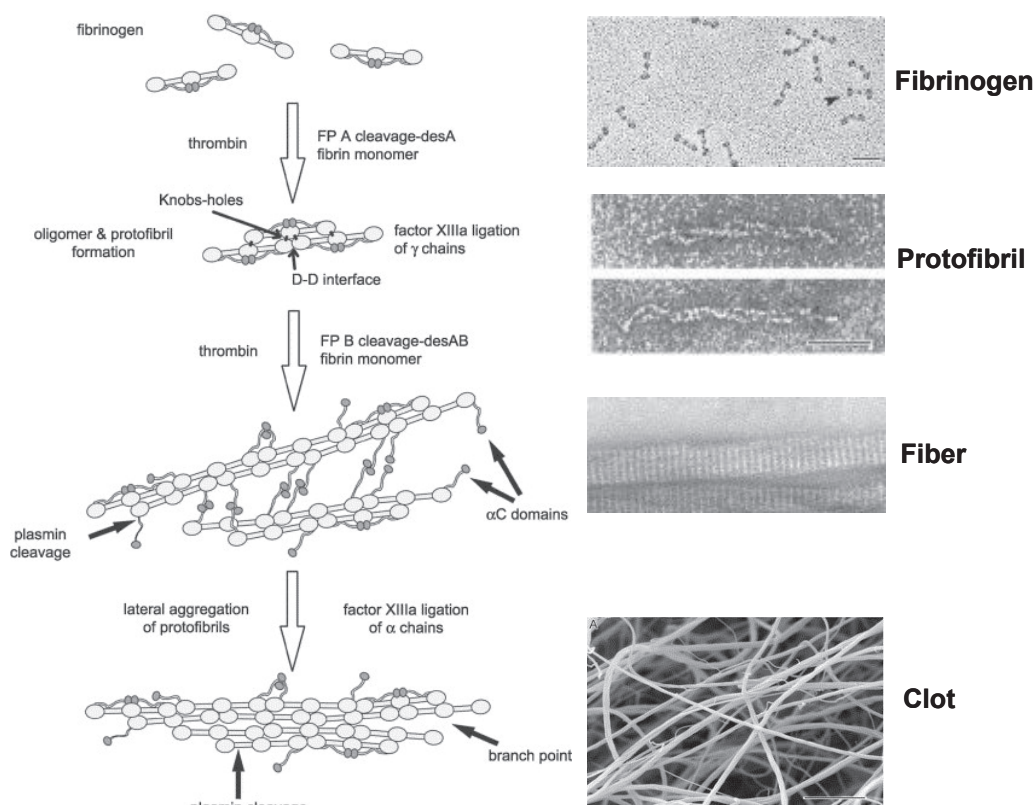


図 1-B フィブリンの重合 (模式図)

(Weisel JW, Adv Protein Chem. 2005 ; 70 : 247-299. Fig3, Fig.6, Fig.7 を組み合わせて作成)

フィブリン形成は、トロンビンによる $A\alpha$ 鎖切断により E ドメイン内の E_A と呼ばれる重合化部位を露出させることにより開始される。 E_A は近接する別のフィブリン分子 D ドメイン内の γ 鎖 337-379 に位置する binding pocket (Da) と相互作用する。この E_A : Da (middle-to-end) 会合により、E と D の両ドメインが交互に重なり合うように配列し、二重鎖のプロトフィブリルを形成する。その後、トロンビンによる $B\beta$ 鎖の切断により、EB が新たな N 末端として露呈し、D ドメイン β 鎖内の相補的な binding pocket (Db) と相互作用すること、さらに $A\alpha$ 鎖由来の αC 同士の間相互作用が広範なフィブリンネットワーク形成において重要な役割を果たす。フィブリンネットワークは、トランスグルタミナーゼである XIIIa 因子による架橋反応によって一層安定化される。

Arg-Val 配列の合成テトラペプチドを添加すると、この重合反応が阻害されることから、重合反応におけるこの配列の重要性は明らかである。

一方、この新しいアミノ末端として露呈する Gly-Pro-Arg-Val 以外にも、重合化部位として機能している部位が、 β 鎖 15-42 内に存在する。すなわち、FpA だけを選択的に除去する蛇毒 (*Borthrops atrox*) 由来のプロテアーゼのレプチラーゼでフィブリノゲンを処理してもフィブリンの重合反応は起きるが、レプチラーゼによる (des-($B\beta$ 1-42)-fibrinogen)^{*2} の重合反応は著しく遅延することから、 $B\beta$ 15-42 が重合化部位の 1 つとして機能しているという。また、 $B\beta$ 9-72 を欠失した異常フィブリノゲン New York I の

重合反応も遅延する。これらの知見から、 β 鎖 15-42 は Gly-Pro-Arg-Val とともに、 E_A の形成に関与すると考えられている。

線状 (二次元) 構造のプロトフィブリルは、その後、“厚み”を持った三次元構造のフィブリルを形成するように側面の会合 (lateral association) を受け、フィブリン繊維を形成し、繊維の伸長過程で枝分かれすることによりフィブリンネットワークを形成する。フィブリンネットワーク内では、2つのタイプの“分岐” (branch junction) が認められる。1つは、二重鎖のフィブリルが集まり、四重鎖のフィブリルを形成するように別のフィブリルと lateral association する際に起きるもので、“bilateral” junction (二面合流) と呼ば

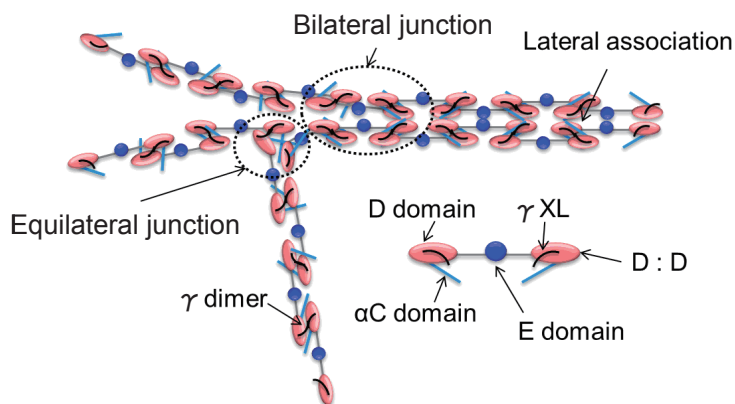


図2 プロトフィブリルの枝分かれ, 会合および γ 鎖の架橋

(Mosesson MW, J Thromb Haemost. 2005 ; 3 : 1894-9043. Fig.2 を参考に作成)

フィブリン線維には, 2種類の分岐が確認される。1つは, 二重鎖フィブリルが別の二重鎖フィブリルと横方向に会合して形成される四重鎖フィブリルで, Bilateral junctionと呼ばれ, フィブリルの横方向への会合によりこの多重鎖構造が形成される。もう1つは, Equilateral junctionと呼ばれ, 3つのフィブリン分子の会合により3つの二重鎖フィブリルが形成される。Equilateral junctionは, トロンビン濃度が薄く, フィブリノペプチドの開裂が遅いときに形成され, このような条件では網目は分岐が多くなり, フィブリンマトリックスはより密な構造となる。また, 側面の会合である Lateral association には, αC 領域が重要な役割を担う。FpBの遊離後にEドメインから解離し, αC 同士で相互作用できるようになる。

Dドメインの γ 鎖にある γXL 部位は, γ 鎖の架橋形成部位と重複する部位である。 γXL 部位間での分子内の会合は, XIIIa因子を介した架橋形成の領域が整列するのに重要である。また, D:D部位は, ポリマー形成におけるフィブリン分子の end-to-end での適切な配置に必要である。

れる。さらに別のフィブリルが lateral association し, 多重鎖構造を有するようになる。もう1つは, “equilateral” junction (三面合流) と呼ばれ, 3つのフィブリン分子間の相互作用によって形成されるもので, 3つの二重鎖フィブリルが合流する。equilateral junctionは, フィブリノペプチドの切断反応の速度が遅いとき (低濃度トロンビンでの反応), 高頻度に形成され, そのネットワークはより分岐しており, フィブリンマトリックスは締まった性状 (多孔性が低い) となる (図2)。

Lateral association には, Eドメイン内の別の重合化部位の E_B が関与する。 E_B はトロンビンにより $B\beta$ 鎖が切断され, FpB ($B\beta 1-14$) を遊離することにより新たなN末端として露呈する Gly-His-Arg-Pro 配列 (ノブB) で, Dドメイン β 鎖内の相補的な binding pocket (Db, β hole, あるいは hole b という) と相互作用することにより, フィブリン形成において重要な役割を果たしている。しかし, ノブA配列を含む合成ペプチド (Gly-Pro-Arg-Val) が重合反応を阻害するのに対して, ノブB配列を含む合成ペプチドにはそうした作用がなく, また, 蛇毒由来のプ

ロテアーゼで FpA だけを除去してもフィブリン重合反応は起きることから (ただし, トロンビンにより FpA および FpB を除去したフィブリンとはその性状が異なる), $E_B : Db$ の相互作用は, $E_A : Da$ のそれに比べ直接的でないといえる。すなわち, $E_B : Db$ 会合の結果, 分子内のコイルドコイルセグメントから βc 領域が引き離されるような Dドメイン βc の再配置が惹起され, 分子間の $\beta c : \beta c$ コンタクトを促進する結果, D:D間 (end-to-end) の lateral association を引き起こす。また, lateral association では, αC も重要な役割を果たす。 $A\alpha$ 鎖由来の αC ($A\alpha$ 鎖 221-610) は, フレキシブルセグメントの αC コネクター ($A\alpha$ 鎖 221-391) と, 独立して折りたたまれたコンパクトなセグメントの αC ドメイン ($A\alpha$ 鎖 392-610) からなる。 αC のC末端を欠いたフィブリノゲンから形成されたフィブリンクロットは, トロンビン時間が延長し, 濁度が低下し, そして細いファイバーを形成することからも, プロトフィブリルの lateral association に αC ドメインが重要な役割を果たしていることがわかる。フィブリノゲン中の αC は, 分子内E

ドメインに非共有結合しているが、FpB遊離後は解離し、他の α Cとの分子間相互作用ができるようになる。それ故、より広範なフィブリンネットワーク形成を促進することになる。また、陰性荷電を帯びたFpBが除去されることで、イオンの反発が消失することも、lateral associationの促進に役立っている。

一方、フィブリンネットワークの構造は、トロンビンや Ca^{2+} 等その形成に直接関与する因子以外の成分によっても大きく影響される。例えば、トロンビンによって活性化された血小板濃染顆粒から放出されるポリリン酸は、トロンビン時には影響を与えないものの濃度依存的にフィブリンファイバーの厚さを高めることにより、フィブリンクロットの濁度を最大で3倍まで高め、また、線溶耐性も高める¹³⁾。動脈硬化や血栓症との関連が示唆されているホモシステインも基本的にはポリリン酸と同様な効果を示す¹⁴⁾。また、種々の細胞で発現し、コラーゲン線維形成の制御因子として機能するプロテオグリカンのデコリンは、フィブリノゲンD領域に結合しクロット形成を遅延させる。デコリン存在下で形成されるファイバーは細く、線溶耐性も低下する¹⁵⁾。

それぞれのDドメインの γ 鎖領域には、フィブリンやフィブリノゲンの会合および架橋に関与する2つの自己会合部位(γ モジュール)、すなわち、“ γ_{XL} ”と“D:D”が含まれる(図1-A)。 γ_{XL} の部位は、 γ 鎖の架橋部位と重なっている。2つの γ_{XL} 部位での分子間会合により、XIIIa因子を介したトランスグルタミナーゼが促進され、架橋領域の“配置”がなされる。各D:D部位は、 γ モジュールの残基275-300間にあり、Dドメインの外側に位置している。これらの部位は、フィブリンポリマー形成におけるフィブリン分子のend-to-endの会合がなされるための適切な配置に必要である。各D:D部位の相互作用が欠損している異常フィブリノゲンTokyo II(γ R275C)では、フィブリンポリマーの形成が遅延している。

フィブリンネットワークは、トランスグルタミナーゼであるXIIIa因子による架橋反応によって一層安定化されるが、このXIIIa因子による架橋反応は生理的に極めて重要であり、事実XIIIa

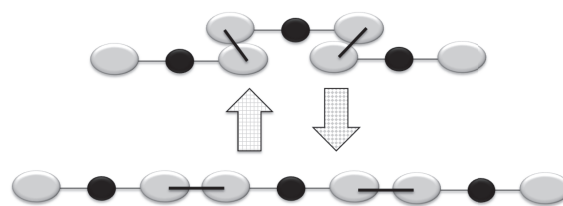


図3 プロトフィブリルの粘弾性的挙動
 γ 鎖で共有結合したフィブリルは伸縮性を示し、二重鎖のフィブリルは、最大1.8倍まで引き伸ばされる。

因子の欠損患者・マウスは出血傾向を示す¹⁶⁾。架橋反応は、 γ - γ 鎖および α - α 鎖間で起きる。XIIIa因子は、 γ 鎖のLys406とGln398間で分子間 ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合を触媒し、 γ ダイマーを形成する。フィブリン凝集を牽引するEa:Da相互作用は、 γ_{XL} 部位での γ 鎖対の逆平行の配置を促進するため、架橋速度が加速される。重合したフィブリンでの γ 鎖の架橋は、フィブリルストランド間で横になされているのか(transversely)、あるいは、フィブリルの各ストランドに沿って縦になされているのか(longitudinally)については結論を得ていないが、Mosesson¹²⁾は、Roskaら¹⁷⁾の報告を基に前者であるとしている。その理由は、フィブリンの粘弾性に基づくとしている。すなわち、架橋フィブリンを牽引したとき最大で1.8倍まで伸張し、牽引を止めると復元する¹⁷⁾が、この結果は、「横に」架橋した二重鎖フィブリルが一重鎖フィブリルに変形することで最大で1.8倍まで伸張し、牽引を止めると、この γ 鎖間の架橋により復元する」と解釈している(図3)。

また、同じ型の分子間 ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合が、 α 鎖間で γ 鎖間より遅い速度で起こり、その結果、 α ポリマーが形成される。その正確な架橋部位については永らく不明であったが、最近、次の9つの特異的な架橋部位が同定された(α 鎖内のGln223-Lys508, Gln223-Lys539, Gln237-Lys418, Gln237-Lys508, Gln237-Lys539, Gln237-Lys556, Gln366-Lys539, Gln563-Lys539, Gln563-Lys601)¹⁸⁾。しかし、これらの架橋が*in vivo*でも起きるという証拠はない。

4. フィブリンへのトロンビン結合性

α -トロンビンが基質であるフィブリノゲンから FpA と FpB を特異的に切断してフィブリンに変換する際, トロンビン (分子) の中にフィブリノゲンを認識・結合する部位があり, これを “exosite 1” という. 興味深い事にこの exosite 1 は, フィブリノゲンのみならず, フィブリンとも結合する. 従ってある条件下では, 生成物であるフィブリンはトロンビンに結合したままとなり, トロンビン活性を阻害する様にも見える. この凝固している血漿内でのフィブリン形成に基づくトロンビン結合活性は, 最初, Seegers¹⁹⁾ によってアンチトロンビン I (AT-I)²⁰⁾ と命名された. AT-I には低親和性と高親和性の2つクラスがあり, 1つは, E ドメイン内に2箇所ある低親和性結合部位で, 他は, γ' を含む D ドメイン内の高親和性結合部位である²⁰⁾. フィブリンの低親和性トロンビン結合活性は, 基質のフィブリノゲンとの相互作用部位であるトロンビン exosite 1 との結合能が残存していることを示しており, フィブリンの α , β , γ 鎖のアミノ末端残基がその結合に関与している. フィブリノゲンやフィブリン内の D ドメインに含まれる高親和性結合部位は, γ' 鎖 414-427 の間に位置しており, γ' 418 と 422 の硫酸化 Tyr 残基がその結合活性を高める. トロンビン exosite 2 は γ' 鎖と相互作用する²¹⁾.

フィブリンやその分解産物の FDP に結合したトロンビンに血栓形成促進能が残存しているかについては議論の分かれるところである. フィブリン血栓内のトロンビンはその凝固活性を保持していることを支持する報告もあり²²⁾, フィブリンはトロンビン活性を隔離し, かつ抑制するという前述した AT-I 活性が, 現在, 広く受け入れられている訳ではない. 一般的には, AT-I の欠乏や異常は, 血栓症のリスクファクターと考えられてはいないが, AT-I に相当する領域の異常は, 血栓症のリスクファクターとなりうることは, 以下の知見から推定される.

①トロンビン結合能が低下しているフィブリノゲン New York I (B β Gly7-Leu72 が欠損) や Naples I (B β 68Ala が Thr に置換)²³⁾ のような分子異常症の患者は, 重度の静脈や動脈血栓塞栓

症を発症する. ②先天性の無フィブリノゲン血症患者で, 特に, 治療用フィブリノゲン製剤の輸注時に血栓塞栓症を発症することがある. これらの患者は出血傾向にあるため, トロンビンが産生されやすく, また, フィブリンにトラップされないため循環血中トロンビンレベルが高く, 血小板も活性化されやすい. こうした状況下でのフィブリノゲン製剤の輸注は, 塞栓形成を誘発することになる²⁴⁾. ③無フィブリノゲン血症患者の血漿では, トロンビン形成のレベルが高まっているが, *in vitro* でフィブリノゲンを添加することによりそのレベルは正常化される. γ' を含まないフィブリノゲン 1 (γ/γ) に比べて γ' を含むフィブリノゲン 2 (γ/γ') の添加の方が, トロンビン生成レベルの正常化により効果的であるという事実が, このプロセスでフィブリノゲン, 特に, γ' を含むフィブリノゲンの役割の重要性を示唆している²⁵⁾.

5. フィブリノゲンおよびフィブリンに親和性を示す蛋白質

種々の蛋白質がフィブリノゲンやフィブリンに親和性を示すことが知られているが, これらの相互作用の意義について以下に述べる. また, それら分子間相互作用の解離定数 (Kd) を表 1 にまとめた.

5.1 線溶因子

プラスミノゲンや tPA に対する結合部位は, フィブリノゲンでは隠れており (cryptic), フィブリンに変換されて初めて出現する. これらのフィブリンに対する Kd はそれぞれ, 320nM²⁶⁾, tPA のそれは 360nM²⁷⁾ で, 両者に共通する結合部位は, フィブリノゲン D ドメインに相当する A α 鎖 148-160 に局在している. 特に, A α 157Lys がクリングルとの相互作用に重要という. また, γ 鎖 312-324 は tPA のみの結合部位として機能している.

線溶阻害因子の α_2 -アンチプラスミン (α_2 -AP) は, 重合したフィブリンには結合するものの (Kd=102nM, また, プラスミノゲン共存下でのそれは 25nM), 溶液中のフィブリノゲンには結

表1 フィブリノゲンおよびフィブリンに親和性を有する蛋白質の解離定数 (Kd)

蛋白質名	解離定数 (Kd)		測定方法
	フィブリノゲン	フィブリン	
α -トロンピン	—	2.3nM ²⁰⁾	RIA ^{*1}
プラスミノゲン ⁱ⁾	結合せず ²⁶⁾	320nM ²⁶⁾	RIA
tPA	結合せず ²⁷⁾	360nM ²⁷⁾	RIA
α_2 -AP ^{*2}	結合せず ⁱⁱ⁾ 28)	102nM ²⁸⁾	SPR ^{*3}
XIIa 因子	3.0nM ⁴³⁾	2.5nM ⁴³⁾	SPR
XIII 因子 (a2b2)	10nM ²⁹⁾	200nM ³⁰⁾	RIA, ELISA
フィブロネクチン	結合せず ²⁾	7.2nM ³⁶⁾	ELISA
HRG ^{*4}	8.8nM ³³⁾	19nM ³³⁾	ELISA
血小板 (α IIa/ β_3)	550nM ³⁸⁾	—	RIA
β -アミロイドペプチド (A β)	26nM ⁱⁱⁱ⁾ 49)	—	FP ^{*5}
VE カドヘリン	結合せず ⁵⁴⁾	80nM ^{iv)} 54)	SPR
CD44	97nM ^{v)} 46)	1.8 μ M ^{vi)} 46)	RIA
デコリン (N 末ペプチド) ^{vii)}	1.7 μ M (D 画分) ⁹⁰⁾	—	FP
Lipoprotein (a) [Lp(a)]	1nM ^{viii)} 92)	—	ELISA

RIA^{*1}: ラジオイムノアッセイ α_2 -AP^{*2}: α_2 -アンチプラスミン SPR^{*3}: 表面プラズモン共鳴

HRG^{*4}: Histidine-rich glycoprotein FP^{*5}: 蛍光偏光法

i) この Kd は Lys-プラスミノゲンの値で, Glu-プラスミノゲンのそれは, 32 μ M.

ii) 溶液中のフィブリノゲンには結合しないが, プレート上に固相化したフィブリノゲンには結合する (Kd=179nM).

iii) D 画分に対する A β 42 の Kd は 54nM

iv) 4つの細胞外 N 末領域を包含する組換え VE-カドヘリンフラグメントの VE-cad (1-4) と (B β 15-66)₂ との Kd.

v) フィブリノゲン画分として (B β 1-66)₂ を使用.

vi) フィブリン画分として (B β 15-66)₂ を使用.

vii) Small leucine rich proteoglycan ファミリーのの一つで, コラーゲン細線維の集合や細胞の増殖などの機能を有する. 生体内ではユビキタスに発現している.

viii) プラスミン処理フィブリノゲンを使用.

合しないことから, フィブリノゲン結合部位は cryptic であることが示唆される (但し, プレート上に固相化しコンフォメーションの変化したフィブリノゲンには結合し, その Kd は 179nM). その結合部位を決めるため, 種々のフラグメントを用いて実験を行い, E ドメインには結合せず D ドメインに結合すること (D ダイマーに対する Kd は 94nM, プラスミノゲン存在下でのそれは 5.5nM), また, 各種 A α 鎖フラグメントを用いた実験から, α_2 -AP は A α 鎖 504-610 で相互作用することが示された (Kd=123nM). α_2 -AP は, フィブリンに高い親和性を有することで XIIIa 因子による架橋を受けやすくし, それが線溶の初期段階を制御すると考えられている²⁸⁾.

5.2 XIII 因子

血漿から調製した I⁻¹²⁵XIII 因子のフィブリノゲンビーズへの結合実験から, I⁻¹²⁵XIII 因子の結合

は可逆的かつ時間および温度依存性で, Ca²⁺に依存しないこと, また, 300mM 以上の食塩濃度で結合の完全な阻害が起こるといふ. Kd は 10nM で, 血漿中の XIII 因子濃度はそれより 7 倍高いことから, XIII 因子は血中ではフィブリノゲンに結合して循環していることが示唆される²⁹⁾. 一方, フィブリンは XIIIa 因子の基質として機能するが, 血漿由来の XIII 因子 (2つの a サブユニットと 2つの b サブユニットを含む: a2b2 と略) および血小板由来の XIII 因子 (2つの a サブユニットのみを含む: a2 と略) とフィブリンの結合について ELISA により調べられている. その結果, ①Kd は a2b2 で 0.2 μ M, a2 で 14 μ M, ②a2b2 でフィブリンの結合を飽和させても, a2 のフィブリンへの結合に影響しない, ③フィブリンは血漿 XIII 因子活性化を促進したが, 血小板 XIII 因子の活性化は促進しないことが分かった. 従って, 血漿 XIII 因子の b 鎖は, 単に a2b2 のフィ

ブリンへのアフィニティーを高めるだけでなく、トロンビンによる血漿 XIII 因子活性化の促進にも関与することが示唆される³⁰⁾。

5.3 Histidine-rich glycoprotein (HRG)

HRG は分子量 67,000 の 1 本鎖糖蛋白質で、フィブリノゲン以外にもヘパリンなどと相互作用し、その凝固活性を中和する。HRG 欠乏症家系では血栓症を起こしやすいという。構成アミノ酸は、His と Pro が最も多く、特に C 末端半分に集中しており、フィブリノゲンに高い親和性を示す。その結合は可逆的であり、変性フィブリノゲンには結合しない。HRG とフィブリノゲンの相互作用は、フィブリノゲンのフィブリン変換に影響を及ぼす。すなわち、フィブリンゲル形成の lag time phase を延長し、かつ濁度上昇の速度を低下させるという。しかし、フィブリン重合化の程度は、HRG によっては影響されないことから、HRG 存在下で形成されるフィブリンは、数は多いがより細いフィブリルからなることが示唆されている³¹⁾。また、HRG のノックアウト (KO) マウスの血漿のプロトロンビン時間は短縮し、形成されたフィブリン塊は溶解し易いという³²⁾。

最近、Vu ら³³⁾ による HRG とフィブリノゲンおよびフィブリンとの相互作用に関する実験から、① Zn^{2+} を添加した血漿中に HRG とフィブリノゲンの複合体が検出されるので、HRG はフィブリノゲンとの複合体として血中を循環し、フィブリンに変換されてもなお複合体として存在する、② K_d は、 γ/γ および γ'/γ フィブリノゲンに対して 8.8nM および 8.9nM、 γ/γ フィブリン、 γ'/γ フィブリンおよび 20 残基の γ' ペプチドに対して各々、19nM、11nM、0.8nM で、 γ' 鎖に高い親和性を示す、③ HRG は、 γ'/γ フィブリン結合に対してトロンビンと競合することによって、凝固反応を調節していることが示唆される。

5.4 フィブロネクチン (FN)

繊維芽細胞等の種々の細胞表面上のレセプターに対して結合能を持つ FN は、細胞の接着・遊走等で重要な役割を果たすため、フィブリンクロット内に FN が取り込まれることで、創傷治癒に促進的に作用すると考えられている。また、血漿

FN 欠損マウスでは、動脈血栓の growth や安定性が低下することが動脈傷害モデルでの実験で示されたことから、FN は血小板のリガンドとして機能し、血小板血栓形成で重要な役割を果たすことが示唆される³⁴⁾。この FN の作用機構を解明するため、フローチャンパーを用いた *ex vivo* の実験が行われ、XIIIa 因子により FN を架橋したフィブリンコート上で形成される血栓は、FN を架橋していないフィブリン、あるいは FN のみでコートした表面上での血栓に比べて大きく、安定であることが示された³⁵⁾。一方、Makogonenko ら³⁶⁾ は、フィブリノゲンおよびフィブリン、 αC フラグメントを用いた FN との結合実験から、FN は、固相化しコンフォメーション変化したフィブリノゲンを含まないフィブリノゲンには全く結合しないが、フィブリンには高い親和性を持って結合することから ($K_d=7.2nM$)、フィブリノゲンの結合部位は cryptic で、フィブリンに変換されてその結合部位が現れるとした。また αC フラグメントを用いた結合実験から、 $A\alpha$ の 221-610 断片および 221-391 までの断片の K_d は、各々 15nM および 11nM で、 $A\alpha$ 392-610 断片は FN に結合しないことから、 $A\alpha$ 221-391 が FN の結合部位であるという。

なお、 αC 以外のフィブリン分子に相当する D-D : E_1 複合体は FN との結合能を有していないことから、 αC のコネクター領域が唯一の FN 結合部位としている。一方、 αC ドメインは、フィブリノゲンではそのリガンドと反応しないことから、フィブリンに変換されて初めてその結合部位が露出し、 αC ポリマーを形成することが示唆される。実際、組換え αC ドメインは濃度依存的に、かつ可逆的に可溶性オリゴマーを形成し、このオリゴマーを XIIIa 因子で架橋させることによって安定化されることも報告されている³⁷⁾。

5.5 活性化血小板

ADP で活性化した血小板膜上の $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($IIb/IIIa$) は、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端の γ 400-411 (HHLGGAKQAGDV) と相互作用し、血小板凝集を惹起する。C 末端に γ 400-411 を含有するプラスミン分解産物のフラグメント $D\gamma_A$ は、ADP による血小板凝集を阻害するが、その活性は γ 400-411 の合成ペプチドより 70 倍強い。フラグメント $D\gamma_A$ は、

ADPで活性化した血小板へのフィブリノゲンの結合を阻害し、また、活性化血小板に直接結合した。フィブリノゲンおよびフラグメントD γ_A のKdは、各々、0.55および1.2 μ Mであった。一方、C末端が427となるフラグメントD γ' は、血小板凝集やフィブリノゲンの結合を阻害せず、血小板表面にも直接結合しない。また、グアニジンでフラグメントD γ_A を変性させると、血小板凝集試験での阻害活性が消失したことから、フィブリノゲンの血小板結合部位である γ 鎖C末端 γ_A 400-411のnative conformationが、IIb/IIIaとの結合には重要であるという³⁸⁾。また、組換え γ Cドメインを用いた結合実験から、 γ 鎖370-381配列中の4つの塩基性アミノ酸クラスター(Lys373, Arg375, Lys380, Lys381)がIIb/IIIaとの結合に関与する³⁹⁾。なお、A α 鎖の2箇所のRGD(Arg-Gly-Asp)配列(95RGDF98, 572RGDS575)もIIb/IIIaと相互作用することが知られている⁴⁰⁾。

5.6 XII因子(Hageman因子)

XII因子KOマウスが、動脈血栓モデルで抵抗性を示すことから、*in vivo*での血栓形成にXII因子が重要な役割を果たすことが示唆されている^{41) 42)}。Konings⁴³⁾らは、XII/XII_a因子はフィブリノゲン/フィブリンと相互作用し、その結果、クロットの構造や機能を制御しているとの仮説を立て、以下の実験結果を得た。

①プロトロンビンとXII因子のダブル欠乏因子ヒト血漿を用いた系や精製した因子の再構成系で、XIIa因子濃度依存性のフィブリンファイバー密度の増加や濁度の減少がみられたことから、XIIa因子存在下では、より高密度な構造のクロットを形成し、その剛性を高めることを示唆した。なお、H-D-Phe-Pro-Argクロロメチルケトンやcorn trypsin inhibitorでXIIa因子活性を阻害すると、これらの効果は消失する。従って、XIIa因子の蛋白分解活性が、フィブリン安定化に寄与している。②精製XII因子やXIIa因子は、フィブリノゲン(Kdは各々3.0nMと4.1nM)やフィブリン(Kdは各々2.5nMと4.6nM)に高い親和性を示す。③ヒト頸動脈血栓の免疫染色により、濃厚なフィブリン沈着が認められる領域でXII因子が共存しているとの結果から、XIIa因子はト

ロンビン生成とは無関係にフィブリンクロットの構造を修飾しているという。

5.7 CD44

CD44は膜貫通型の糖鎖に富む蛋白質で、20のエクソンから選択的スプライシングにより多種の産物が生成されるが、最も分子量の小さい341アミノ酸残基からなる37kDaのCD44s(standard)は種々の組織に存在し、特に造血系の細胞で強く発現している。一方、最大で分子量250kDaとなる多種類のバリエーションフォームのCD44vは、幾つかの上皮組織や癌細胞にだけ発現しており、その発現が亢進すると生存率が低下する。CD44は炎症、造血、創傷治癒、癌転移に関与するが、特に、そのリガンドであるヒアルロン酸へのCD44を介した腫瘍細胞の接着は、癌転移で重要な役割を果たす⁴⁴⁾。一方、フィブリンは原発巣の腫瘍細胞が血管系を介してターゲット細胞に転移する際に、腫瘍細胞をクロット内に閉じ込め安定化することで血管壁への接着や拡散に関与している。実際、フィブリノゲンKOマウスは転移を起こしにくいことから、腫瘍細胞の転移でフィブリンが重要な役割を果たすことが示されている⁴⁵⁾。

大腸癌細胞株のLS174T上のCD44は主要なフィブリンレセプターであるが、フィブリノゲンには結合しないことが知られている。CD44sとCD44vのフィブリン/フィブリノゲンとの相互作用の生化学的な性質については不明であったが、Alvesら⁴⁶⁾によりその詳細が明らかになり、以下の知見が得られた。①大腸癌細胞株のLS174Tから精製したCD44でコートしたマイクロスフィアは、流動下で固相化したフィブリンに結合する。対照的に、白血病細胞株のHL-60からのCD44sは、流動下で固相化したフィブリノゲンおよびフィブリンの両方に結合する。②LS174TのCD44のフィブリン結合は、CD44のO型糖鎖依存性であり、一方、CD44sのフィブリノゲンやフィブリンへの結合は、N型糖鎖⁴⁴⁾依存性で、O型糖鎖は関与しない。③CD44の機能を阻害するモノクロナル抗体のHermes-1は、CD44sとフィブリノゲンやフィブリンの結合にはなんら影響しないが、LS174T由来のCD44のフィブリン結合を阻害する。④CD44結合部位

は, β 15-66 を含むフィブリン β 鎖の N 末端部分に局在している. ⑤SPR (表面プラズモン共鳴) の実験から, 固相化した CD44 は可溶性フィブリンに高い親和性を持って結合するが, フィブリノゲンには結合しない.

また, フィブリノゲンの固相化は, CD44s への結合を仲介することから, この固相化により cryptic site が露出したと推定される. これらの知見は, 癌転移を制御する新規の薬剤をデザインする上で有用と考えられている.

5.8 補体レクチン経路に関与する因子のマンノース結合レクチンおよびフィコリン

補体活性化経路の 1 つである「レクチン経路」は, 「パターン認識分子」のマンノース結合レクチン (MBL) やフィコリン⁴⁵ が感染菌外膜の糖鎖と結合することによって開始されるが, MBL やフィコリンがフィブリノゲンやフィブリンにも相互作用し, 結果としてレクチン経路を亢進することが明らかになった^{47) 48)}.

MBL はコラーゲン様ドメインと CRD (Ca²⁺ 依存性の糖認識ドメイン) からなり, 血漿中でセリンプロテアーゼの MASP (MBL-associated serine protease) との複合体として存在し, MBL が PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) に結合すると, MASP が活性化され補体レクチン経路が活性化する. 一方, フィコリンはコラーゲン様ドメインとレクチン活性を有するフィブリノゲン様ドメインからなり, MASP と複合体を形成する. Endo ら⁴⁷⁾ は, 両因子とフィブリノゲン, フィブリンとの結合実験を行い, ① MBL は, フィブリノゲン A α 鎖や B β 鎖よりもフィブリン α 鎖や β 鎖に強く結合するが, γ 鎖には結合しない, ②フィコリン A は, A α 鎖や B β 鎖と同等に α 鎖や β 鎖にも結合するが, γ 鎖には結合しないことを明らかにした. また, 上記の相互作用がレクチン経路の補体活性化にどのように影響するかを調べ, ①正常マウス血清による *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 上での C3 沈着活性は, フィブリノゲン添加によって高まり, トロンビン添加によってさらに増強する, ②MBL とフィコリンを除去した血清に MBL-MASP 複合体あるいは, フィコリン-MASP 複

体をフィブリノゲンとともに加えると, *S. aureus* 上での C3 沈着活性は増強し, トロンビン添加によってさらに増強したことから, 細菌の表面で形成されたレクチンとフィブリノゲン, フィブリンからなるネットワークが, レクチンによる細菌の認識を安定化させ, 結果として補体活性化を高めると考察している.

5.9 β -アミロイドペプチド (A β)

β -アミロイドペプチド (A β) は, アルツハイマー病患者の脳実質や脳血管壁に蓄積し, 病気の進展に関与していると考えられている. A β はフィブリノゲンに特異的に結合し⁴⁹⁾ (Kd=26nM), フィブリンクロットが A β 存在下で形成されると, その構造を変化させ線溶耐性になる⁵⁰⁾. 最近, この A β の構造変化と線溶耐性の亢進についての詳細な機構が調べられ, 以下の知見が得られた⁵¹⁾. ①A β_{42} はフィブリンに特異的に結合し, 細い繊維と高い線溶耐性によって特徴付けられるよりタイトなフィブリンネットワークを形成するように誘導する. ②前もってフィブリンクロットを作成後, クロット上を覆うように添加した A β_{42} もまたフィブリンに結合し, 線溶を遅延させることから, A β_{42} 惹起性の構造変化だけが, 線溶を遅延させる機構ではない. ③A β_{42} 含有フィブリンクロットは, tPA によるプラスミン生成やプラスミンによるフィブリン分解が遅延するので, 線溶阻害は, A β_{42} による plasmin (ogen)-フィブリン結合の阻害が原因と考えられる.

5.10 白血球

傷害血管部位への白血球の集積は, 血管修復の際の血栓のリモデリングに重要である. β_2 インテグリンファミリーの $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$ などが, fibrin (ogen) レセプターとして機能する. *in vitro* でフィブリンは, インテグリンを介して強力な白血球接着活性を示すことから, *in vivo* で血管内クロット表面上にこれらの細胞が蓄積していると予想されるが, 種々の手法を用いてもフィブリン上で検出されない. フィブリンクロットへの白血球の過度な接着はプロテアーゼの作用による血栓の不安定化にもつながるので, 何らかの制御機構が働いていると考えられる.

表2 フィブリノゲンの翻訳後修飾

修飾の種類	修飾部位	病態および機能との関連	分類
AGE ⁵⁵⁾ *1	特定されていない	糖尿病, 動脈硬化症	A
Arg 残基のシトルリン化 ^{56) - 59)}	A α 鎖の Arg5 残基と B β 鎖の Arg2 残基	関節リウマチ	A
ニトロ化 ^{61) 62)}	B β 鎖 Tyr ²⁹² , Tyr ⁴²²	血栓性疾患	A
ヒドロキシル化 ⁶³⁾	A α 鎖 Pro ⁵⁶⁵ , B β 鎖 Pro ³¹	Pro ⁵⁶⁵ のみ膵臓癌患者で高値	A
N型糖鎖 (100%) ^{66) - 68)}	B β 鎖 Asn ³⁶⁴ , γ 鎖 Asn ⁵²	血中での代謝回転に関連か?	B
O型糖鎖 (1~13%) ⁶⁹⁾	A α 鎖 Thr ³⁰¹ , Ser ³³² を含む7箇所 (γ 鎖には存在しない)	生理的意義は不明	B
リン酸化 (25%) ⁷⁰⁾	A α 鎖 Ser ³ , Ser ³⁴⁵	生理的意義は不明	B
硫酸化 (100%) ⁷¹⁾	γ '鎖 Tyr ⁴¹⁸ , Tyr ⁴²²	トロンビン結合能を高める*2	B
ピログルタミル化 (100%) ⁷⁰⁾	B β 鎖 Gln ¹	アミノペプチダーゼ分解耐性か?	B
Met 残基の酸化 (0~20%) ⁷⁰⁾	特定されていない	生理的意義は不明	B
α_2 アンチプラスミン ^{72) - 74)}	A α 鎖 Lys ³⁰³	線溶耐性を高める	C
セロトニン ⁷⁵⁾	特定されていない	血小板血栓形成能を高める	C

() 内は修飾率

分類 A: 病態と関連した修飾, B: 健康人で起こる生理的な修飾, C: XIIIa 因子を介した修飾

*1: Advanced Glycation Endproducts (終末糖化産物)

*2: ウシやイヌのフィブリノペプチド B に含まれる Tyr にも見出される (ヒトのフィブリノペプチド B にはない)。

このフィブリンクロット表面上で作用する抗細胞接着活性に、フィブリノゲンが関与することが示された。すなわち、フィブリンでコートしたプレートに単球や好中球を添加するとフィブリンに接着するが、前もってフィブリノゲンを添加しておくことで細胞接着が阻害されるという。このフィブリノゲンの効果はインテグリンをブロックするためではなく、フィブリンと弱く会合することにより、白血球がフィブリンと相互作用しにくくなるためだという。このフィブリノゲンの阻害効果は流動条件化でも認められた⁵²⁾。フィブリノゲンはフィブリンと複合体を形成し、トロンビンでの活性化を受けることなく自己会合し凝集体を形成するが、その結果、インテグリンを介した細胞接着を阻止する伸張性で多重構造のマトリックスが形成される。このフィブリノゲンの接着阻害活性には αC 領域が重要で、 αC 領域を欠失したフィブリノゲンが凝集しても、細胞接着能を有する伸張性のないマトリックスを形成するという⁵³⁾。

6. 翻訳後修飾の機能および病態との関連

多数の血漿蛋白質と同様にフィブリノゲンも糖鎖付加に加えて、リン酸化、硫酸化等の種々の翻訳後修飾を受けるが、ここでは細胞外での修飾も

含め、病態との関連やそれらの生理的意義について述べる (表2 参照)。

6.1 翻訳後修飾と病態との関連

6.1.1 Methylglyoxal による修飾と動脈硬化との関連⁵⁵⁾

糖尿病は冠動脈疾患のリスクを高めるが、終末糖化合物 (AGE: Advanced Glycation Endproducts) は、糖尿病性の血管合併症の主要な病因であると考えられている。Methylglyoxal (MGO) 由来の主要な AGE である hydroimidazolone の存在をヒト動脈で試験し、MGO 由来の修飾が、主に内膜肥厚した細胞や外膜微小血管の細胞で検出され、fibrin (ogen) のほか細胞骨格会合蛋白質の moesin や核膜蛋白質の lamin A および C が MGO 修飾の主要なターゲット蛋白質として同定された。また *in vitro* で、5 μ M (糖尿病患者で検出される濃度より幾分高い) の MGO をフィブリノゲンと 24 時間インキュベーションした後の hydroimidazolone の存在を調べ、A α 鎖の 5 残基 (A α 167, 199, 491, 528, 559) および B β 鎖の 2 残基 (B β 169, 304) の Arg での修飾を確認した。フィブリノゲンのこうした修飾は、糖尿病での血管の機能低下や動脈硬化の進展に関連した問題であろう。

6.1.2 Arg 残基のシトルリン化と関節リウマチとの関連

関節リウマチ (RA) は, 関節の炎症とアルギニンに由来するシトルリン⁶⁶ 含有蛋白質に対する自己抗体によって特徴付けられる自己免疫疾患である. 種々のシトルリン化蛋白質に対する自己抗体が存在するが, 特にフィブリノゲンは患部関節の炎症組織内で見出されるため, RA での主要なシトルリン化自己抗原の1つとなっている. RA 患者およびコントロールとして RA 以外の他の関節炎患者滑液中のシトルリン化ペプチドの存在を分析した結果, RA 患者の滑液には, 有意な量のシトルリン残基やリン酸化されたセリン残基を含むフィブリノゲン由来の可溶性ペプチドが検出された. また, 関節を患部とする他の炎症性疾患患者に比べて, RA 患者の滑液中にはそうしたペプチドがより多く存在するという. 従って, RA 患者自己抗体によるシトルリン化ペプチドや蛋白質の認識に基づく免疫応答において, フィブリノゲンが特異的な役割をもつ可能性が示唆される⁵⁶⁾.

シトルリン化フィブリノゲンが病態発症に関係していることは, 以下の報告からも示唆される. ①II型コラーゲン誘導関節炎マウスで, 環状シトルリン化ペプチド⁵⁷⁾ やシトルリン化フィブリノゲンに対する抗体が産生された. また, 抗シトルリン化フィブリノゲンモノクロナル抗体投与により, 軽度の抗II型コラーゲン抗体誘導関節炎を悪化させた⁵⁷⁾. ②マウス RA モデルで, シトルリン化酵素の peptidylarginine deiminases (PADs) を阻害すると, 症状が軽減する⁵⁸⁾. ③シトルリン化フィブリノゲンと自己抗体との複合体が RA 患者で検出されているが, この複合体はマクロファージからの TNF- α 産生を誘導する⁵⁹⁾.

6.1.3 Tyr 残基のニトロ化と血栓性疾患との関連

血中フィブリノゲンレベルが高くなると, 冠動脈疾患のリスクが高まるが, 最近, その発症予知にフィブリノゲンレベルの測定が有用であることが報告された⁶⁰⁾. 一方, チロシン残基がニトロ化された蛋白質のレベルが冠動脈疾患を有する患者で高いことから, フィブリノゲンのニトロ化について調べられ, ①冠動脈疾患患者でニトロ化フィ

ブリノゲンレベルが特異的に増加する. ②亜硝酸塩存在下, ミエロペルオキシダーゼ (MPO) と過酸化水素に暴露されたニトロ化フィブリノゲンは, 有意にクロット形成や XIIIa 因子による架橋形成の速度が高まる. また, 形成されたクロットの走査電子顕微鏡での観察から, その構造は細いフィブリン繊維の大きな束からなることや大きな間隙の存在が示されたが, 事実, クロットの浸透性が高まっていた. ③一方, 亜硝酸塩非存在下, 同じ酸化剤に暴露された塩素化フィブリノゲンは高密度で均一なフィブリンネットワーク構造を有しており, クロット形成速度や透過性が低下することが示された. それ故, フィブリノゲンのニトロ化は, 血栓形成促進のリスクファクターとなることが示唆される⁶¹⁾.

in vivo でのフィブリノゲンのニトロ化の主要な部位として, β 鎖C末端の Tyr292 と Tyr422 が同定され, フィブリノゲンのニトロ化の結果, 4つの変化を起こす. すなわち, ①フィブリンクロット形成の初速度が高められ, ②フィブリンクロット構造が変化し, ③フィブリンクロットの固さが高まり, ④フィブリン溶解時間が遅延することである. フィブリン形成速度やクロットの構造は, チロシンがニトロ化されたフィブリノゲン分子を除去すると修復する. また, ノブ B (前述) をミミックしたペプチドの Gly-His-Arg-Pro や Ala-His-Arg-Pro に対する反応性が高まることから, ニトロ化されたフィブリノゲン分子は, フィブリンの lateral association を加速させると考えられる. 従って, ニトロ化を伴う修飾は, 酸化ストレスや炎症, さらに血栓性疾患との疫学的な関連を説明する新規のバイオマーカーとなるかもしれない⁶²⁾.

6.1.4 Pro 残基のヒドロキシル化と癌との関連

LC-MS/MS で経時的に得られるデータをデジタル処理する新規のプロテオーム解析法を用いて, フィブリノゲン α 鎖の Pro565 が水酸化されていることが見出された. この修飾されたフィブリノゲンレベルが, 種々の病態の患者血漿で ELISA により測定された. 160名の膵臓癌患者の測定では, ステージ IA⁶⁸⁾ では健康人 (113名) と差がないが, ステージ IB 以上に進行すると有意に高値となる. こうした高値は他の癌や慢性炎

症疾患の患者でもみられたが、良性の膵臓癌／嚢胞患者や胆嚢炎患者ではみられなかった。また、正常フィブリノゲン B β 鎖の Pro31 の約 20% は水酸化されているが、癌患者での変動はないという⁶³⁾。

6.2 その他の翻訳後修飾

蛋白質は多様な糖鎖により修飾を受けることで種々の性状を獲得しているが^{64) 65)}、フィブリノゲン B β 鎖の Asn364⁶⁶⁾ および γ 鎖の Asn52⁶⁷⁾ には N 型糖鎖が付加されている。B β 鎖と γ 鎖の糖鎖は同様なオリゴ糖構造を有しており、主に、二分岐の digalactosylated monosialylated 構造と二分岐の digalactosylated disialylated 構造からなる⁶⁸⁾。また、A α 鎖の Thr301, Ser332 を含む 7 箇所 (γ 鎖には存在しない) は O 型糖鎖も付加されている⁶⁹⁾。糖鎖修飾は、過剰な重合反応や分解を阻止する役割を果たすと考えられている⁷⁰⁾。

A α 鎖の 25% で 2 つの Ser 残基 (A α 3 および 345) がリン酸化されている。炎症反応の急性期相で生合成されるフィブリノゲンのリン酸化の程度は 70% まで高まるが、その後、phosphatase により分解されるため 25% 程度のリン酸化となる。FpA の Ser 残基のリン酸化によりトロンビン結合能が高まるが、フィブリノペプチドの遊離速度には影響しないという⁷⁰⁾。

多数の動物種の FpB に含まれる Tyr は硫酸化されているが、ヒトでは硫酸化されていない。硫酸化部位は、 γ '鎖の Tyr418 および 422 で 100% 修飾されており (前述)、トロンビン結合能を高めるといふ⁷¹⁾。また、B β 鎖 N 末端の Gln は全て環化されたピログルタミル残基に修飾されているが、これが酵素的なものか非酵素的なものか明白でない。

6.3 トランスグルタミナーゼを介した修飾

α 2-アンチプラスミン (α 2-AP) : α 2-AP は XIIIa 因子により fibrin (ogen) に架橋され、線溶耐性となるが、その架橋部位は、フィブリノゲン A α 鎖の Lys303 と α 2-AP の N 末端に近い Gln2 の間である⁷²⁾。XIIIa 因子による α 2-AP のフィブリンへの架橋が、線溶耐性に決定的に重要であることが、血漿を用いた *in vitro* での tPA 惹

起フィブリンクロット溶解試験で示された。すなわち、①XIII 因子、あるいは α 2-AP 欠損血漿でのクロット溶解時間は、正常血漿を用いたときに比べて 9 倍速く溶解するが、PAI-1 や TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) を欠損させても溶解時間は変化しない。②クロット溶解速度は、架橋 α 2-AP 量に逆相関した。③XIII 因子欠乏血漿に XIII 因子を補充すると、 γ ダイマーや α ポリマーが形成され、クロットは線溶耐性となるが、抗 α 2-AP 抗体存在下では線溶耐性は消失する。従って、フィブリン間の架橋ではなく α 2-AP の架橋が、線溶耐性のレベルを決定付けるといえる⁷³⁾。なお、血漿から単離されたフィブリノゲン画分の ELISA による測定で、循環血中フィブリノゲンは 1 分子あたり 1.2 ~ 1.8 分子の α 2-AP を架橋していることが示された。この α 2-AP 架橋フィブリノゲンは、線溶の制御で重要な役割を果たすという⁷⁴⁾。

セロトニン : Alberio ら⁷⁵⁾ は、コラーゲンとトロンビンで血小板を共刺激すると、一部の血小板上だけで α 顆粒の血液凝固第 V 因子が出現し、血小板上にとどまることを示し、この血小板を COAT-platelets と命名した。彼らはまた同様な実験を行い、別の α 顆粒蛋白質である vWF や α 2AP, FN も COAT-platelets に結合するが、トランスグルタミナーゼ阻害剤存在下では結合しないことを明らかにした。また、トランスグルタミナーゼは、血小板濃染顆粒から放出されたセロトニンをこれらの蛋白質に架橋させる (フィブリノゲンは、1 分子当たり 7.6 ± 3.4 分子のセロトニンを架橋) ことを示した。しかし、この反応の意義は明白にされていない⁷⁶⁾。

7. フィブリノゲンの臨床応用—フィブリン接着剤

出産時出血や重度の外傷等による重篤な出血の止血管理にフィブリノゲン濃縮製剤が用いられ、その有用性は高く評価されているが⁹³⁾、フィブリノゲンレベルがどの程度低下すれば濃縮製剤の投与を開始すべきなのかについてのコンセンサスは十分でなく、また、過度なフィブリノゲン製剤の投与は血栓塞栓症のリスクを高めることになるので、個々の患者の状態 (血小板数や他の凝固因子

レベル, 出血の原因等)を考慮し, その投与や投与量は慎重に決定されるべきとの意見もある⁹⁴⁾. フィブリノゲンは, このような静注用フィブリノゲン製剤だけでなく, フィブリン接着剤としても広く臨床応用されており, その詳細について以下に記す.

外科手術において, 切断または離断された組織を接着・閉鎖する手段としては縫合が最も一般的な方法として用いられてきたが, 処置に時間を要すること, 組織の状態やその部位によっては縫合が困難なこと, 縫合することによってかえって治癒を妨げるケースもあることなどの欠点が指摘されている.

これらの問題を克服し, 組織に損傷を与えることなく組織の接合が行われるような手術の研究がなされてきた. 例えば, 組織を接合するフィブリン接着剤は, この目的を達成する手段の一つとしてかなり古くから研究されてきた. フィブリン接着剤は, フィブリノゲンにトロンピンが作用して形成されるフィブリンの膠着性を利用して組織の接着・閉鎖を行うものであり, その組成はフィブリノゲンおよびトロンピン, XIII 因子, アプロチニンからなる. フィブリン接着剤は生体由来成分であることから, 異物反応などの組織への影響も認められず, 生体内では最終的に分解・吸収される. 当初フィブリン接着剤は, シアノアクリレート系等の合成接着剤に比べて安全性は高いものの接着閉鎖力は低いと認識されていたが, その効果が使い次第で著しく高まることが認識されるに及び, フィブリン接着剤単独あるいは各種医用材料と組み合わせて損傷組織での止血, 縫合部の補強, エアーおよび体液漏出の阻止, 組織欠損部の補強および被覆など多様な目的で, 広く用いられるようになった.

この効果の高い使い方は, 「塗布方法や塗布器具の開発」により可能になったが, 接着力を高める塗布方法として, 「擦り込みスプレー法」が開発された. 組織の細やかな凹凸にまでフィブリノゲン液を浸透させた後に, 均一に混合するようにフィブリノゲン液とトロンピン液をスプレー塗布し, 組織に深く嵌り込んだフィブリンゲルを形成することによりアンカー効果を高めるとともに, フィブリンの組織に対する接触面積を広くするこ

とで接着効果が向上した. また, 医療用材料の超薄型のポリグルコール酸 (PGA) 不織布との併用により, その効果がさらに高まった. すなわち, PGA 不織布と組み合わせたフィブリン接着剤は, 組織の凹凸に吸い付くように貼りつき, フィブリン接着剤単独に比べて機械的強度が高まる⁷⁷⁾.

現在, 「組織の接着閉鎖」の効能・効果を有するフィブリン接着剤は, 医療現場での有用性を確かなものにしてきているが, 今後, 本稿で述べたフィブリノゲンの多機能性にも注目しつつ「再生医療」への応用も期待している. 例えば, フィブリン接着剤と PGA 不織布で作成した代用硬膜を用いることにより, 自己硬膜の再生が起きると報告されている⁷⁸⁾. また, 骨, 神経, 心筋再生の足場として, フィブリンの臨床応用が期待される.

8. フィブリノゲンの分子進化—フィブリノゲン様ドメイン含有蛋白質の発見

従来, 脊椎動物のフィブリノゲン α , β , γ 鎖間のアミノ酸配列の相同性は高いことから, これら各鎖の遺伝子は共通の祖先に由来したものと考えられており, $A\alpha$ 鎖が約 10 億年前, $B\beta$ および γ 鎖が約 6 億年前に分かれたと推測されている. 従って, これらの分子は脊椎動物と無脊椎動物に分岐する以前から存在していたが, 1990 年, Doolittle ら⁷⁹⁾ は, ヤツメウナギとヒトフィブリノゲン間で保存されている配列を基にプライマーを作成し, 種々の無脊椎動物から調製した cDNA を PCR で増幅し, ナマコから調製した cDNA の中にフィブリノゲン様の配列を見出した. フィブリノゲン関連蛋白質 A および B (FReP-A, FReP-B) と名付けたこれらの蛋白質は, ヒトフィブリノゲン $B\beta$ および γ 鎖 C 末端の 2/3 の領域を含んでいた (フィブリノゲンの D 領域に相当). また, 互いに一次および三次構造上でも高い相同性を示し, この領域を“フィブリノゲン様ドメイン”と呼んだ. その後, フィブリノゲン様ドメインを含有する分子が, 多数の無脊椎動物で同定され, 現在までに知られているこれらの分子の大部分は, 生体防御に関連していた^{2) 80)}. また, その後の無脊椎動物のゲノムプロジェクトでの研究から, ゲノム中に驚くほど多数のフィブリノゲン様

表3 フィブリノゲン様ドメイン含有蛋白質をコードする遺伝子数⁸⁰⁾

分類 (門)	遺伝子数 (個体名)	
脊索動物	ナメクジウオ類	428
	ホヤ類	174
棘皮動物		102 (アメリカムラサキウニ)
環形動物 (2網)		116 (ヒル)
節足動物 (23網)		59 (ハマダラカ)
線形動物 (9網)		14 (センチュウ)
扁形動物 (1網)		0
刺胞動物 (2網)		21 (ヒドラ)
板形動物 (1網)		0
軟体動物		70 (カサガイ)

遺伝子座の存在が明らかとなり、現在、無脊椎動物のフィブリノゲン様蛋白質の多様な機能が注目されている (表3)⁸⁰⁾。

フィブリノゲン様ドメインは、進化的には、少なくとも単細胞真核生物の襟鞭毛虫まで遡って保存されている⁸¹⁾。それらの感染防御との関連は、多数の無脊椎動物や脊椎動物でも示されており、例えば、P35 (L フィコリン) や Hakata 抗原 (H フィコリン) のような哺乳類のフィブリノゲン様含有蛋白質は、補体系を活性化する機能と同様に、パターン認識レセプターとして作用することによって、脊椎動物の自然免疫応答で役割を果たしている⁸²⁾。一方、脊椎動物においてフィブリノゲンのフィブリンへの変換は、凝固のために必要不可欠なプロセスであるが、こうした止血へのフィブリノゲンの関与は系統発生的にはどちらも新口動物である (ホヤが属する) 尾索類の *Botryllus schlosseri*⁸³⁾ や (ナメクジウオが属する) 頭索類の *Branchiostoma frolidae*⁸⁴⁾ で知られていた。例えば、ホヤ類の *Botryllus schlosseri* では、9 個の凝固因子相同分子種の転写産物の発現がある⁸³⁾。しかし、無脊椎旧口動物の一部では、凝固カスケードに関与する分子が完全に欠損しているため、フィブリノゲンを介した凝固は起きない。一方、血流は弱いものの軟体動物では血液凝固系に相当するようなプロセスがあるという⁸⁵⁾。また、ナメクジウオゲノムでは、フィブリノゲン関連ドメインを含有する多数の遺伝子 (>400 種) はあるものの⁸⁶⁾、凝固カスケードの他の成分は何一つ同定されてい

ない⁸⁷⁾。ナメクジウオゲノムの分析後に出された証拠から、ナメクジウオは脊索動物の最も遠い先祖であるといわれる。また、フィブリノゲンを介した凝固に必要な基本的な構成成分が現れるのは、尾索類や無顎類が発生してからということからも、この仮説は正しいと考えられる。それ故、無顎類と頭索類の間で、フィブリノゲンのフィブリン変換を伴う体液凝固反応が起こり始めたと推測される^{83) 88)}。なお、カブトガニ体液中の C-タイプレクチンに相当する Tachylectin 5A と 5B には、フィブリノゲン γ 鎖と β 鎖類似の構造のあることが明らかにされている^{2) 89)}。

9. おわりに

以上、本稿ではフィブリノゲン研究の現況に焦点を絞って述べた。フィブリノゲン様ドメインは単細胞生物まで広く保存されており、感染防御で重要な役割を担っている。また、フィブリノゲンはフィブリン変換し、止血栓を形成することで出血の制御において重要な役割を果たすだけでなく、翻訳後修飾や種々の蛋白質との相互作用を介して、生理的なイベントや各種病態に関わっている。このようなフィブリノゲンの“多様性”が、さらに広がるのか？あるいは、こうした多様性がフィブリノゲンの機能を真に反映したものかについて、今後も注目していきたい。

謝辞：稿を終えるにあたり、校閲していただいた化血研の水口 純 博士、嘉悦 洋 博士、新屋 希子 博士、執筆の機会を与えていただいた武谷 浩之 先生 (崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科 教授) に深謝します。

略 語

FpA：フィブリノペプチド A, FpB：フィブリノペプチド B, AT-I：アンチトロンビン I, FDP：フィブリン分解産物 (Fibrin Degradation Product), HRG：Histidine-rich glycoprotein, FN：フィブロネクチン, LC-MS/MS：液体クロマトグラフィー質量分析法, SPR：表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance), MBL：マ

ンノース結合レクチン (Mannose-Binding Lectin), MASP: MBL-associated serine protease, A β : β アミロイドペプチド, vWF:フォンヴィルブランド因子, MGO:メチルグリオキサール (methylglyoxal), FReP-A: フィブリノゲン関連蛋白質 A (fibrinogen related protein A), RA: 関節リウマチ (rheumatoid arthritis), PGA: ポリグリコール酸

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) 岩永貞昭: 血液凝固因子の分子進化—フィブリノーゲンと von Willebrand 因子を中心に—, 血栓止血誌 **19**: 292-299, 2008.
- 2) 極壇聡太郎, 嘉悦洋, 水口純, 岩永貞昭: 自然免疫を担うフィブリノーゲン様ドメイン含有蛋白質ファミリーの構造と生理機能, 血栓止血誌 **15**: 238-256, 2004.
- 3) 松田道生, 諏合輝子, 中三川千鶴子: 遺伝性フィブリノーゲン血症, 血栓止血誌 **12**: 47-56, 2001.
- 4) 水口純, 中垣智弘, 岩永貞昭: フィブリノーゲンの欠損マウス, 血栓止血誌 **8**: 156-158, 1997.
- 5) 水口純: フィブリノーゲンの構造と機能, 黎明 **5**: 18-34, 1996.
- 6) Mosesson MW, Siebenlist KR, Hainfeld Jf, Wall JS, Soria J, Soria C, Caen JP: The relationship between the fibrinogen D domain self-association/cross-linking site (gammaXL) and the fibrinogen Dusart abnormality (Aalpha R554C-albumin): clues to thrombophilia in the "Dusart syndrome". J Clin Invest **97**: 2342-2350, 1996.
- 7) Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW: Human plasma fibrinogen heterogeneity: Evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal γ chain variant (γ'). Proc Natl Acad Sci USA **77**: 5069-5073, 1980.
- 8) Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C: Covalent structure of fibrinogen. Ann N Y Acad Sci **408**: 28-43, 1983.
- 9) Tang L, Eaton JW: Fibrin (ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. J Exp Med **178**: 2147-2156, 1993.
- 10) Dyr JE, Tichy I, Jirouskova M, Tobiska P, Slavic R, Homola J, Brynda E, Houska M, Suttner J: Molecular arrangement of adsorbed fibrinogen molecules characterized by specific monoclonal antibodies and a surface Plasmon resonance. Sens Actuators B Chem **51**: 268-272, 1998.
- 11) Riedel T, Suttner J, Brynda E, Houska M, Medved L, Dyr JE: Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. Blood **117**: 1700-1706, 2011.
- 12) Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost **3**: 1894-1904, 2005.
- 13) Smith SA, Morrissey JH: Polyphosphate enhances fibrin clot structure. Blood **112**: 2810-2816, 2008.
- 14) Lauricella AM, Quintana I, Castanon M, Sasseti B, Kordich L: Influence of homocysteine on fibrin network lysis. Blood Coagul Fibrinolysis **17**: 181-186, 2006.
- 15) Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Hook M: Decorin modulates fibrin assembly and structure. J Biol Chem **281**: 38208-38216, 2006.
- 16) Koseki-Kuno S, Yamakawa M, Dickneite G, Ichinose A: Factor XIII A subunit-deficient mice developed severe uterine bleeding events and subsequent spontaneous miscarriages. Blood **102**: 4410-4412, 2003
- 17) Roska FJ, Ferry JD: Studies of fibrin film: I. Stress relaxation and birefringence. Biopolymers **21**: 1811-1832, 1982.
- 18) Wang W: Identification of respective lysine donor and glutamine acceptor sites involved in factor XIIIa-catalyzed fibrin α chain cross-linking. J Biol Chem **286**: 44952-44964, 2011.
- 19) Seegers WH, Niefert M, Loomis EC: Note on the adsorption of thrombin on fibrin. Science **101**: 520-521, 1945.
- 20) Meh DA, Siebenlist KR, Mosesson MW: Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. J Biol Chem **271**: 23121-23125, 1996.
- 21) Pospisil CH, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI: Evidence that both exosites on thrombin participate in its high affinity interaction with fibrin. J Biol Chem **278**: 21584-21591, 2003.
- 22) Mutch NJ, Robbie LA, Booth NA: Human thrombi contain an abundance of active thrombin. Thromb Haemost **86**: 1028-1034, 2001.
- 23) Koopman J, Haverkate F, Lord ST, Grimbergen J, Mannucci PM: Molecular basis of fibrinogen Naples associated with defective thrombin binding and thrombophilia. Homozygous substitution of B β 68 Ala \rightarrow Thr. J Clin Invest **90**: 238-244, 1992.
- 24) Dupuy E, Soria C, Molho P, Zini J-M, Rosenstingl S, Laurian C, Bruneval P, Tobelem G: Embolized ischemic lesions of toes in an afibrinogenemic patients: possible relevance to *in vivo* circulating thrombin. Thromb Res **102**: 211-219, 2001.
- 25) de Bosch NB, Mosesson MW, Ruiz-Sáez A, Echenagucia M, Rodriguez-Lemoin A: Inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation (Antithrombin I). Thromb Haemost **88**: 253-258, 2002.
- 26) Lucas MA, Fretto LJ, McKee PA: The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. J Biol Chem **258**: 4249-4256, 1983.
- 27) Horrevoets AJG, Smilde A, de Vries C, Pannekoek H: The specific role of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during *in vitro* fibrinolysis. J Biol Chem **269**: 12639-12644, 1994.
- 28) Tsurupa G, Yakovlev S, McKee P, Medved L: Non-covalent interaction of α_2 -antiplasmin with fibrin (ogen): Localization of α_2 -antiplasmin binding sites. Biochemistry **49**: 7643-7651, 2010.
- 29) Greenberg CS, Shuman MA: The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. J Biol Chem **257**: 6096-6101, 1982.
- 30) Hornyak TJ, Shafer JA: Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. Biochemistry **31**: 423-429, 1992.
- 31) Leung LLK: Interaction of histidine-rich glycoprotein with fibrinogen and fibrin. J Clin Invest **77**: 1305-1311, 1986.
- 32) Tsuchida-Straeten N, Ensslen S, Schäfer C, Wöltje M, Denecke B, Moser M, Gräber S, Wakabayashi S, Koide T, Jahnhen-Dechent W: Enhanced blood coagulation and fibrinolysis in mice lacking histidine-rich glycoprotein (HRG). J Thromb Haemost **3**: 865-872, 2005.
- 33) Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI: Histidine-rich glycoprotein binds fibrin (ogen) with high affinity and competes with thrombin for binding to the γ' -chain. J Biol Chem **286**: 30314-30323, 2011.
- 34) Ni H, Yuen PST, Papalia JM, Trevithick JE, Sakai T, Fässler R, Hynes RO, Wagner DD: Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. Proc Natl Acad Soc USA **100**: 2415-2419, 2003.
- 35) Cho J, Mosher D: Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. Blood **107**: 3555-3563, 2006.
- 36) Makogonenko E, Tsurupa G, Ingham K, Medved L: Interaction of fibrin (ogen) with fibronectin: Further characterization and localization of fibronectin-binding site. Biochemistry **41**: 7907-7913, 2002.
- 37) Tsurupa G, Mahid A, Veklich Y, Weisel JW, Medved L: Structure, stability, and interaction of fibrin α C-domain polymers. Biochemistry **50**: 8028-8037, 2011.
- 38) Kirschbaum NE, Mosesson MW, Amrani DL: Characterization

- of the γ chain platelet binding site on fibrinogen fragment D. *Blood* **79** : 2643-2648, 1992.
- 39) Podolnikova NP, Gorkun OV, Loreth RM, Yee VC, Lord ST, Ugarova TP : A cluster of basic amino acid residues in the γ 370-381 sequence of fibrinogen comprises a binding site for platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb/IIIa). *Biochemistry* **44** : 16920-16930, 2005.
- 40) Plow EF, Marguerie G : Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by the tetrapptide glycyl-L-prolyl-L-arginyl-L-proline. *Proc Natl Acad Soc USA* **79** : 3711-3715, 1982.
- 41) Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Renné C, Gailani D, Nieswandt B, Renné T : Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral infarction without interfering with hemostasis. *J Exp Med* **203** : 513-518, 2006.
- 42) 中富靖, 中垣智弘 : 内因系凝固研究の現状—XII因子, XI因子及び高分子キニノーゲンの欠損マウスについて—. *血栓止血誌*, **20** : 323-328, 2009.
- 43) Konings J, Govers-Riemslog JWP, Philippou H, Mutch NJ, Borissoff JI, Allan P, Mohan S, Tans G, ten Vate H, Ariens RA : Factor XIIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* **118** : 3942-3951, 2011.
- 44) Kim HR, Wheeler MA, Wilson CM, Iida J, Eng D, Simpson MA, McCarthy JB, Bullard KM : Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells *in vitro* via interaction with CD44. *Cancer Res* **64** : 4569-4576, 2004.
- 45) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Komblinck KW, Jirousková M, Degen JL : Platelets and fibrin (ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105** : 178-185, 2005.
- 46) Alves CS, Yakovlev S, Medved L, Konstantopoulos K : Biomolecular characterization of CD44-fibrin (ogen) binding: distinct molecular requirements mediate binding of standard and variant isoforms of CD44 to immobilized fibrin (ogen). *J Biol Chem* **284** : 1177-1189, 2009.
- 47) Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T : Interaction of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Imm* **2** : 33-42, 2010.
- 48) 遠藤雄一 : 補体レクチン経路と凝固系の協調作用—補体系研究の新展開—, *血栓止血誌* **22** : 164-170, 2011.
- 49) Ahn HJ, Zamolodchikov D, Cortes-Canteli M, Norris EH, Glickman JF, Strickland S : Alzheimer's disease peptide β -amyloid interact with fibrinogen and induces its oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** : 21812-21817, 2010.
- 50) Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, Bronstein R, Ahn HJ, Zamolodchikov D, Bhuvanendran S, Fenz KM, Strickland S : Fibrinogen and β -amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease. *Neuron* **66** : 695-709, 2010.
- 51) Zamolodchikov D, Strickland S : A β delays fibrin clot lysis by altering fibrin structure and attenuating plasminogen binding to fibrin. *Blood* **119** : 3342-3351, 2012.
- 52) Lishko VK, Burke T, Ugarova T : Antiadhesive effect of fibrinogen: a safeguard for thrombus stability. *Blood* **109** : 1541-1549, 2007.
- 53) Yermolenko IS, Gorkun OV, Fuhrmann A, Podolnikova NP, Lishko VK, Oshkadyerov SP, Lord ST, Ros R, Ugarova T : The assembly of nonadhesive fibrinogen matrices depends on the α C regions of fibrinogen molecule. *J Biol Chem* **287** : 41979-41990, 2012.
- 54) Gorlatov S, Medved L : Interaction of fibrin (ogen) with endothelial cell receptor VE-cadherin : Mapping of the receptor-binding site in the NH₂-terminal portions of the fibrin β chains. *Biochemistry* **41** : 4107-4116, 2002.
- 55) Lund T, Svindland A, Pepaj M, Jensen AB, Berg JP, Kilhovd B, Hanssen KF : Fibrin (ogen) may be an important target for methylglyoxal-derived AGE modification in elastic arteries of humans. *Diab Vasc Dis Res* **8** : 284-294, 2011.
- 56) Raijmakers R, van Beers JJ, EL-Azzouny M, Visser NF, Bozic B, Pruijn GJ, Heck AJ : Elevated levels of fibrinogen-derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* **14** : R114, 2012.
- 57) Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM : Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* **116** : 961-973, 2006.
- 58) Willis VC, Gizinski AM, Banda NK, Causey CP, Knuckley B, Cordova KN, Luo Y, Levitt B, Glogowska M, Chandra P, Kulik L, Robinson WH, Arend WP, Thompson PR, Holers VM : N- α -benzoyl-N⁵-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* **186** : 4396-4404, 2011.
- 59) Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G : Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor α through Fc γ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* **58** : 678-688, 2008.
- 60) The Emerging Risk Factors Collaboration : Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, et al. : C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* **367** : 1310-1320, 2012.
- 61) Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bennett JS, Murciano JC, Muzykantov V, Penn MS, Hazen SL, Weisel JW, Ischiropoulos H : Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* **279** : 8820-8826, 2004.
- 62) Parastatidis I, Thomson L, Burke A, Chernysh I, Nagaswami C, Visser J, Stamer S, Liebler DC, Koliakos G, Heijnen HF, Fitzgerald GA, Weisel JW, Ischiropoulos H : Fibrinogen β -chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *J Biol Chem* **283** : 33846-33853, 2008.
- 63) Ono M, Matsubara J, Honda K, Sakuma T, Hashiguchi T, Nose H, Nakamori S, Okusaka T, Kosuge T, Sata N, Nagai H, Ioka T, Tanaka S, Tsuchida A, Aoki T, Shimahara M, Yasunami Y, Itoi T, Moriyasu F, Negishi A, Kuwabara H, Shoji A, Hirohashi S, Yamada T : Prolyl 4-hydroxylation of α -fibrinogen: A novel protein modification revealed by plasma proteomics. *J Biol Chem* **284** : 29041-29049, 2009.
- 64) 津田博子, 岩永貞昭 : 血液凝固線溶異常—糖鎖の多様性を中心に, *臨床検査* **39** : 52-58, 1995.
- 65) 西村仁, 川畑俊一郎, 岩永貞昭 : 4.3 凝固因子その他 (グリコバイオロジー シリーズ1, 糖鎖の多様な世界, 木幡陽, 箱守仙一郎, 永井克孝編集, 東京, 講談社サイエンティフィック), 1993, 227-252.
- 66) Topfer-Petersen E, Lottspeich F, Henschen A : Carbohydrate linkage site in the β chain of human fibrin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **357** : 1509-1513, 1976.
- 67) Blomback B, Grondahl NJ, Hessel B, Iwanaga S, Wallen P : Primary structure of human fibrinogen and fibrin. II. Structural studies on NH₂-terminal part of γ chain. *J Biol Chem* **248** : 5806-5820, 1973.
- 68) Adameczyk B, Struwe WB, Ercan A, Nigrovic PA, Rudd PM : Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. *J Proteome Res* **12** : 444-454, 2013.
- 69) Zauner G, Hoffmann M, Koeleman CA, Dragan I, Deelder AM, Wuhler M, Hensbergen PJ : Glycoproteomic analysis of human fibrinogen reveals novel regions of O-glycosylation. *J Proteome Res* **11** : 5804-5814, 2012.
- 70) Henschen-Edman AH : Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease. *Ann NY Acad Sci* **936** : 580-593, 2001.
- 71) Meh DA, Siebenlist KR, Brennan SO, Holyst T, Mosesson MW :

- The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb Haemost* **85** : 470-474, 2001.
- 72) Kimura S, Aoki N : Cross-linking site in fibrinogen for α 2-plasmin inhibitor. *J Biol Chem* **261** : 15591-15595, 1986.
- 73) Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ : The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α 2-antiplasmin cross-linking. *Blood* **117** : 6371-6374, 2011.
- 74) Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Lee KN, Christiansen VJ, McKee PA : Evidence that α 2-antiplasmin becomes covalently ligated to plasma fibrinogen in the circulation : a new role for plasma factor XIII in fibrinolysis regulation. *J Thromb Haemost* **6** : 1565-1570, 2008.
- 75) Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL : Surface expression and functional characterization of α -granule factor V in human platelets : Effect of ionophore A23187, thrombin, collagen and convulxin. *Blood* **95** : 1694-1702, 2000.
- 76) Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L : Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* **415** : 175-179, 2002.
- 77) 新屋希子 : フィブリン接着剤の臨床応用と将来展望, 黎明 **20** : 12-25, 2011.
- 78) Terasaka S, Iwasaki Y, Shinya N, Uchida T : Fibrin glue and polyglycolic acid nonwoven fabric as a biocompatible dural substitute. *Neurosurgery* **58** : 134-139, 2006.
- 79) Xu X, Doolittle RF : Presence of a vertebrate fibrinogen-like sequence in an echinoderm. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** : 2097-2101, 1990.
- 80) Hanington PC, Zhang SM : The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *J Innate Immun* **3** : 17-27, 2011.
- 81) King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, Marr M, Pincus D, Putnam N, Rokas A, Wright KJ, Zuzow R, Dirks W, Good M, Goodstein D, Lemons D, Li W, Lyons JB, Morris A, Nichols S, Richter DJ, Salamov A, Sequencing JG, Bork P, Lim WA, Manning G, Miller WT, McGinnis W, Shapiro H, Tjian R, Grigoriev IV, Rockhsar D : The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* **451** : 783-788, 2008.
- 82) Matsushita M, Fujita T : The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiology* **205** : 490-497, 2002.
- 83) Oren M, Escande ML, Paz G, Fishelson Z, Rinkevich B : Urochordate histoincompatible interactions activate vertebrate-like coagulation system components. *PLoS ONE* **3** : e3123, 2008.
- 84) Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutiérrez EL, Dubchak I, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-I T, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PW, Satoh N, Rokhsar DS : The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453** : 1064-1071, 2008.
- 85) Miller DA, Rateliff NA : Invertebrate ; Turner RJ (ed) : a Comparative Approach. New York, Wiley, 1994, pp29-60.
- 86) Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, Liu T, Yang M, Wu K, Liu H, Ge J, Yu Y, Huang H, Dong M, Yu C, Chen S, Xu A : Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Res* **18** : 1112-1126, 2008.
- 87) Doolittle RF : Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **74** : 35-40, 2009.
- 88) Doolittle RF, Jiang Y, Nand J : Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates. *J Mol Evol* **66** : 185-196, 2008.
- 89) Gokudan S, Muta T, Tsuda R, Koori K, Kawahara T, Seki N, Mizunoe Y, Wai SN, Iwanaga S, Kawabata S : Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 10086-10091, 1999.
- 90) Dugan TA, Yang VW, Muquillan, DJ, Hook M : Decorin binds fibrinogen in a Zn²⁺-dependent interaction. *J Biol Chem* **278** : 13655-13662, 2003.
- 91) Fu Y, Grieninger G : Fib420 : A normal human variant of fibrinogen will two extended α chain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 2625-2628, 1994.
- 92) LoGrasso PV, Cornell-Kennon S, Boettcher BR : Cloning, expression, and characterization of human apolipoprotein(a) kringle IV37. *J Biol Chem* **269** : 21820-21827, 1994.
- 93) Rahe-Meyer N, Sørensen B : Fibrinogen concentrate for management of bleeding. *J Thromb Haemost* **9** : 1-5, 2011.
- 94) Ozier Y, Hunt BJ : Fibrinogen concentrate for management of bleeding : against indiscriminate use. *J Thromb Haemost* **9** : 6-8, 2011.

*¹ 含量は低いが (1%), α 鎖の C 末端に 236 残基のアミノ酸が付加した 420kDa のバリエーションフォームも存在する⁹¹⁾

*² フィブリノゲンを蝮毒 (*Crotalus atrox*) 由来のプロテアーゼ III で処理すると B β 鎖 1-42 を欠失したフィブリノゲン (des-(B β 1-42)-fibrinogen) を調製することができる。

*³ 現在この名称はほとんど使われていない。

*⁴ アスパラギンに結合した糖鎖は N 型糖鎖と呼ばれ, Asn-X-Ser/Thr という配列中の Asn に N-グリコシド結合する。一方, Ser/Thr に O-グリコシド結合した糖鎖は O 型糖鎖と呼ばれる。

*⁵ フィブリノゲンの γ 鎖ドメインを含むフィコリンは, ヒトでは 3 種類 (L-フィコリン, M-フィコリン, H-フィコリン), マウスでは 2 種類 (フィコリン A とフィコリン B) 存在する⁴⁸⁾。

*⁶ シトルリンは, peptidylarginine deiminase (PAD) によるアルギニンの脱イミン反応により形成される。すなわち, アルギニン側鎖のイミド基が酸素に変換される。

*⁷ シトルリン化フィラグリニンユニットにシスチン残基を導入して, 人工的に環状化した分子 (cyclic citrullinated peptide : CCP) で, その抗体 (抗 CCP 抗体) は RA の診断に有用。

*⁸ ステージ IA も IB も初期段階の癌でリンパ節への転移はなく, 癌は脾臓の内部に局限しているが, 大きさが 2cm 以内が IA, 2cm 以上が IB。