



Localization in the fibrinogen γ -chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 米川, 修 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1415

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 138号	学位授与年月日	平成 5年 3月 2日
氏 名	米 川 修		
論文題目	Localization in the fibrinogen γ-chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen (組織プラスミノゲンアクチベータを介するプラスミノゲンの活性化を増強するフィブリノゲンの γ 鎖上の新たな部位の局在)		

医学博士 米川 修

論文題目

Localization in the fibrinogen γ -chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen

(組織プラスミノゲンアクチベータを介するプラスミノゲンの活性化を増強するフィブリノゲンの γ 鎖上の新たな部位の局在)

論文の内容の要旨

[はじめに]

フィブリン (FBN) は、線維素溶解現象 (線溶) においてプラスミン (PLN) の単なる基質だけでなく、組織性プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) による PLN 生成を増強させる補助因子でもあり、FBN、もしくは、フィブリノゲン (FBG) 上の A α 鎖の148から160番の (A α -[148-160]) の部分に、その増強作用のあることが明らかにされている。しかしながら、A α -[148-160]のみでは、プラスミノゲン (PLG) の1から4番のクリングル構造を欠いた mini-PLG の活性化に際し増強作用を示さないなど FBN の線溶活性化増強作用の全ては説明できず、新たな増強作用部位の存在の可能性が示唆されていた。今回、FBN 上の新たな PLG 活性化を増強させる部位の存在が見いだされ、その局在について検討した。

[方法]

精製した FBN を、ブロムシアンにて切断し、水に対して透析し凍結乾燥した標品を、最少量の希蟻酸を用いて溶解後、Biogel P-2 カラムにて分画した。この溶出画分を用い、t-PA による PLG の活性化に対する増強作用を検討した。検出方法は、生成した PLN 活性を、PLN の合成基質である S2251から遊離されるパラニトロアニリドの発色を計測する測定系を利用した。対照とする緩衝液添加時との比較により、増強活性を算出した。次に、増強活性の認められた画分を回収精製し、SDS-PAGE にて分子量を推定し、Edman 法によりアミノ酸配列を決定した。また、これら画分の持つ、循環血中に生理的に存在している状態の glu-PLG、上記の mini-PLG と、クリングル構造を全て欠いた micro-PLG に対する活性化増強作用、さらに、glu-、mini- と micro-PLG、並びに t-PA に対する結合を検討した。

[結果]

線溶活性増強作用は、A α -[148-160]を含む FCB-2 に相当する高分子領域と低分子領域の二カ所に検出された。低分子領域のものは、SDS-PAGE にて分子量6500と求められ、還元下での SDS-PAGE の結果、スルフィド結合で結ばれた2本鎖のペプチドであることが明らかになった。アミノ酸配列の決定により、低分子領域の線溶増強ペプチドは、 γ 鎖326と γ 鎖339のシステインにて結合した γ -[313-336]と γ -[337-379]から構成された FBG のブロムシアンペプチド FCB-5 であることが判明した。スルフィド結合の切断後、活性は検出されず、FCB-5 の示す増強作用におけるスルフィド結合の重要性が示唆された。FCB-5 は、FCB-2 と異なり、mini-、並びに micro-PLG の活性化も増強することが明らかになった。また、FCB-5 は、glu-、mini-、micro-PLG には結合せず t-PA に結合することが明らかになった。

〔考察〕

FCB-5上の活性増強部位は、mini-、並びに micro-PLG の活性化を増強するなど FBN の活性増強作用における $A\alpha$ -[148-160] を補う意義を持つものと思われる。また、PLG の活性化に際し、PLG、FBN、t-PA の三者が複合体を形成すると言われており、 $A\alpha$ -[148-160] が PLG に結合し、FCB-5 が t-PA に結合することは、活性化の機序を探る意味で興味あることである。また、 $A\alpha$ -[148-160] や FCB-5 の一部に対する抗体は、FBN 特異性であり、本抗体を用いて循環血中の FBN、並びに FBN 分解産物を測定すると言う臨床応用も可能と思われる。

〔結語〕

以上の成績から、FCB-5 が、FBG もしくは FBN 上に存在する新たな線溶活性増強部位であることが示された。

論文審査の結果の要旨

血栓溶解は生理的にも臨床的にも重要な現象である。血栓は血管内で血液が固まったものを言うが、初期は血小板塊からなり、後に凝固が始まって、フィブリン塊からなる。一般に正常な血管内では凝固はおこらない。しかし血管壁に動脈硬化性変化がおこると、この表面で血流は乱れ、血小板は凝集し、血栓形成と共に凝固がおこる。これが冠動脈におこれば心筋梗塞をおこすし、脳動脈におこれば脳梗塞となる。この治療には血栓溶解しかない。

凝固塊のフィブリンはプラスミンにより溶解されるが、プラスミンは血中では前駆物質のプラスミノゲンとして存在する。プラスミノゲンはプラスミノゲンアクチベータ (PA) により活性化されてプラスミンになるが PA には大別して3種類ある。主として尿中に見出される u-PA、主として血管壁から放出される t-PA、細菌由来の SK である。

t-PA はフィブリン存在下でプラスミノゲンの活性化能を著しく亢進する。このためフィブリン内の t-PA 活性亢進部位の同定には多くの研究者が興味を持っていた。

申請者のグループは、フィブリノーゲンを CNBr で分解した分画 (FCB-1～5、と呼称される分画等を含む) の中に t-PA と結合し、さらに t-PA の活性を高める分画があることをつきとめ、これがフィブリノーゲンの $A\alpha$ -[148-160] 部位と同定した。これは FCB-2 と名付けられている。

(結果)

申請者は、フィブリノーゲンの CNBr 分画の中に、さらに今まで同定されなかった t-PA 活性亢進部位のあることを見出した。分子量は6500で、構造は γ 鎖の [311-379] ; FCB-5 の部位で、これは S-S 結合したヘアピン構造をしている。しかし、CNBr 処理により2本鎖になっているこの S-S 結合を還元したものは、t-PA 活性亢進作用はなく、高次構造の重要性を示唆した。FCB-5 は、FCB-2 と異なりプラスミノゲンとは結合せず、さらにプラスミノゲンのうち小分子のミニ、ミクロプラスミノゲンの活性化を促進した。この FCB-5 は t-PA とは結合した。

(考察)

フィブリノーゲンは t-PA 活性亢進作用を持たないので、FCB-5 はフィブリノーゲンがフィブリンに

なる時分子表面に出て来ると考えられる。このため、FCB-5 に対するモノクローナル抗体を作成すれば血中でフィブリノーゲンと反応せず、フィブリンと反応する抗体を得ることが出来る。また、quadroma を作り、一方は t-PA や u-PA、もう一つの epitope は FCB-5 と結合するようにすれば、t-PA や u-PA をフィブリンと結合させ作用させうる。また、この部位の異常がフィブリノーゲンの重合にどのように働くかをしらべ、重合機構や異常フィブリノーゲンの解明に役立つと考えられる。

(質疑)

- 1) フィブリノーゲンと t-PA、またはプラスミノーゲンの結合部位に差はあるか。
- 2) フィブリンがポリマをつくるときの部位と FCB-5 の関係。
- 3) フィブリノーゲンの異常症のうち γ 鎖の異常はどのくらい有るか。
- 4) フィブリノーゲンの異常症のアミノ酸の置換部位におこり易い所は有るか。
- 5) Fbg.Vlissingen の DNA の sequence の読み方。
- 6) Afibrinogenemia は、日本ではどのくらい有るか。
- 7) 凝固因子における、凝固活性と蛋白量の乖離の鑑別の最も良い方法は何か。
- 8) フィブリンはプラスミンの基質であると同時に、プラスミノーゲン、t-PA と complex を作り、プラスミノーゲンからプラスミンへの変換を著しく促進する。この時、t-PA と complex を作っているフィブリンもプラスミンの基質になり得るのか、それとも少数のフィブリンが t-PA を活性化し、これとは別のフィブリン分子がプラスミンにより溶解されるのか。

これらの質問に対する申請者の回答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和

副査 教授 市 山 新 副査 教授 菅 野 剛 史

副査 教授 寺 尾 俊 彦 副査 講師 中 辻 理 子