

氏名	こん どう ひろ かず 近 藤 博 和
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3108 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Constitutive GDP/GTP Exchange and Secretion - dependent GTP Hydrolysis Activity for Rab27 in Platelets (血小板における Rab27 への恒常的 GDP/GTP 交換活性および顆粒分泌依存性 GTP 加水分解活性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 横 出 正 之 教 授 淀 井 淳 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

急性冠症候群は、プラークの破綻に引き続いて起こる、血小板の活性化が引き金となり、動脈血栓を形成して発症する。血小板の濃染顆粒には血小板自身のアゴニストである ADP やセロトニンが含まれており、血小板の活性化に伴い濃染顆粒が分泌されて周囲の血小板を次々と活性化する。このように濃染顆粒の分泌が血小板の機能を発揮するのに大きな役割を果たしており、濃染顆粒分泌の分子機構を解明することが重要である。

近年、透過型血小板を用いた濃染顆粒分泌解析系が確立され、低分子量 G 蛋白質 Rab27 が血小板の濃染顆粒の分泌を制御していることが明らかとなった。一般には低分子量 G 蛋白質は、細胞の静止時には不活性型である GDP 結合型で存在し、細胞にシグナルが入ると活性型である GTP 結合型となり、エフェクター分子と結合して下流へシグナルを伝える分子スイッチとして機能していると考えられている。しかし、Rab27 の活性制御機構については明らかにされていない。

そこで、本研究では血小板における Rab27 の活性化を測定する 2 種類の解析系を確立し、その活性制御機構を検討した。第一に抗 Rab27 抗体を用いて Rab27 の免疫沈降を行い、Rab27 に結合しているヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーにより解析した。第二に Rab27 の特異的なエフェクター分子である Slac2-b の GTP 結合型 Rab27 結合ドメインを用いて、GTP 結合型 Rab27 をプルダウンし定量化した。その結果、静止状態の血小板において Rab27 は、その多くが、活性型とされる GTP 結合型で存在し、これは恒常的な GDP/GTP 交換活性により維持されていることがわかった。さらに、トロンビン刺激による濃染顆粒の分泌に伴って GTP 加水分解活性が増強し、GTP 結合型 Rab27 の割合が大幅に減少した。また、ストレプトライシン O を用いて形質膜を透過型にした血小板においても同様の検討を行った。形質膜透過型血小板において  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させると濃染顆粒の分泌が起こり、それに伴って GTP 結合型 Rab27 の減少が観察された。さらに、濃染顆粒の分泌に GTP 結合型 Rab27 が加水分解されることが必須なのか、分泌の結果として加水分解されるのかを検討した。前者の場合、GTP 結合型 Rab27 が加水分解されて、結合していたエフェクター分子が解離し、その結果下流にシグナルが伝わるというネガティブレギュレーターとして働いていると考えられ、後者の場合、Rab27 は分子スイッチとして機能しているのではなく、エフェクター分子を繫留しておき、濃染顆粒を分泌の準備状態に維持する働きをしていると考えられる。加水分解されない GTP のアナログである GppNHp を結合させた形質膜透過型血小板において  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させたところ、濃染顆粒の分泌は十分認められたが、GTP 結合型 Rab27 の減少は観察されなかった。これにより、GTP 結合型 Rab27 の加水分解は濃染顆粒の分泌に必須ではなく、分泌の結果として加水分解される可能性が示唆された。

本研究により、静止状態の血小板において、濃染顆粒分泌の制御因子である Rab27 は、活性型である GTP 結合型に維持され、濃染顆粒分泌に伴って加水分解されて GTP 結合型が減少することが示された。さらに、GTP 結合型 Rab27 の加水分解は、濃染顆粒分泌には必須ではない可能性が示唆され、Rab27 は血小板濃染顆粒の分泌においてシグナルを伝える分子スイッチとして機能しているのではなく、濃染顆粒を分泌の準備状態に維持する機能を担っている可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

血小板は活性化に伴い、自身のアゴニストを含んでいる濃染顆粒を分泌し、周囲の血小板を次々に活性化させて、これが血栓形成の引き金となる。近年、申請者らは透過型血小板を用いた濃染顆粒分泌解析系を確立し、低分子量 G 蛋白質 Rab27 が血小板の濃染顆粒の分泌を制御していることを明らかにした。Rab27 は他の低分子量 G 蛋白質同様、GTP の結合した活性型と GDP の結合した不活性型の 2 つのコンフォメーションをとるが、本研究では、非刺激時および刺激時の血小板における Rab27 の活性化状態が解析された。この結果、静止状態の血小板において、濃染顆粒分泌の制御因子である Rab27 は、恒常的な GDP/GTP 交換活性により、活性型である GTP 結合型に維持されており、血小板の活性化によって起こる濃染顆粒分泌に伴い、加水分解されて GTP 結合型が減少することを明らかにした。さらに、GTP 結合型 Rab27 の加水分解は、濃染顆粒分泌には必須ではない可能性が示され、Rab27 は血小板濃染顆粒の分泌においてシグナルを伝える分子スイッチとして機能しているのではなく、濃染顆粒を分泌の準備状態に維持する機能を担っている可能性が示唆された。

以上の研究は、血小板の活性化において重要な役割を担う、濃染顆粒分泌制御の分子機構の一端を明らかにしたもので、今後の血小板活性化分子機構の解明、さらには、抗血栓治療への応用に寄与するところが大きい。

したがって、本研究は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認められる。

なお、本学位申請者は平成19年2月28日実施の、論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。