

氏名	しらかわ りゅうたろう 白川 龍太郎
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第 3113 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	Munc13-4 Is a GTP-Rab27-binding Protein Regulating Dense Core Granule Secretion in Platelets (Munc13-4は GTP 型 Rab27 結合蛋白質であり, 血小板濃染顆粒分泌を制御する)
論文調査委員	(主査) 教授 前川 平 教授 野間 昭典 教授 長澤 丘 司

論 文 内 容 の 要 旨

ある種の細胞は細胞外刺激に応じて放出される特殊化された分泌顆粒を持つ。その放出過程を調節性エキソサイトーシスと呼ぶ。神経細胞における神経伝達物質の放出や膵β細胞におけるインスリンの分泌などがそれにあたる。血小板もこのような分泌能を有する細胞であり、血管障害部位においては速やかに活性化され、凝固因子、接着因子などを盛んに分泌する。血小板濃染顆粒には、セロトニン、ADP など血小板自身に対するアゴニストが含まれているため、活性化に伴う濃染顆粒の分泌は周囲の血小板の連鎖的な活性化を促し止血作用に重要な役割を果たす。一方、動脈硬化巣の破綻したような状況においては、過剰な濃染顆粒分泌が血栓症を引き起こす原因ともなる。

調節性エキソサイトーシスも含め、小胞輸送一般の制御因子として Ras スーパーファミリーに属する Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質が知られている。Rab も他の G 蛋白質と同様に GTP 結合型で下流の蛋白質 (エフェクター) に結合し機能する。本研究では、血小板濃染顆粒の分泌に関わる Rab の同定、および、その作用機構の解明を目的とした。

細菌の穴形成毒素、streptolysin-O により形質膜を透過型にした血小板を用いた分泌アッセイ系により各種 Rab の関与を検討したところ、濃染顆粒の分泌は C 末端の脂質修飾を欠く GTP 型の Rab27 により阻害された。他の Rab による阻害は見られなかった。また、Rab27 の特異的エフェクターとして知られている Slac2-b の GTP 型 Rab27 結合領域 (Slp homology domain: SHD) を分泌アッセイ系に加えたところ、濃染顆粒分泌は抑制された。Rab27 との結合能を欠く変異体では抑制されなかった。これらの結果は GTP 型の Rab27 と、そのエフェクターが濃染顆粒分泌に必要であることを示唆した。また、密度勾配遠心法により血小板細胞内小器官を分離すると、Rab27 は濃染顆粒分画に局在した。

次に、血小板における Rab27 エフェクターの同定を試みた。アフィニティークロマトグラフィー法により GTP 型 Rab27 に特異的に結合する蛋白質を血小板細胞質より精製したところ、分子量 120kDa の蛋白質が得られ、質量分析による解析の結果、Munc13-4 であることがわかった。Munc13-4 は、神経伝達物質の放出に必須の因子、Munc13-1 の非神経型ホモログであり、既知の Rab27 結合領域 (SHD) を持たない新規の Rab27 エフェクターであった。Sf9 昆虫細胞より精製した遺伝子組み換え Munc13-4 は GTP 型 Rab27 にのみ特異的に直接結合した。また、遺伝子組み換え Munc13-4 を分泌アッセイ系に加えることにより、濃染顆粒分泌は濃度依存的に増強された。さらに、遺伝子組み換え Munc13-4 により、脂質修飾を欠く Rab27 による分泌阻害は回復された。これらの結果は Munc13-4 が Rab27 のエフェクターとして機能していることを示した。

本研究により、1) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab27 が血小板濃染顆粒の分泌を制御していること、2) 血小板における Rab27 のエフェクターは Munc13-4 であり、濃染顆粒分泌に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また、本研究は、Rab による Munc13 ファミリー蛋白質の直接制御機構の存在、および、神経系以外の細胞での調節性エキソサイトーシスにおける Munc13 ファミリー蛋白質の関与を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

血小板は血管傷害部位において速やかに活性化され、細胞内顆粒に含まれる凝固因子、接着因子などを調節性エキソサイトースにより分泌する。血小板濃染顆粒には ADP、セロトニンなどの血小板自身に対するアゴニストが含まれるため、活性化に伴う濃染顆粒の分泌は止血作用に重要であるとともに、血栓形成の引き金ともなる。本研究では血小板濃染顆粒分泌を制御する Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の同定、およびその作用機構の解明を目的とした。形質膜透過型血小板を用いた濃染顆粒分泌アッセイにより濃染顆粒分泌に関わる Rab を検討したところ、濃染顆粒分泌はドミナントネガティブ Rab27 により特異的に阻害された。次に、血小板における GTP 型 Rab27 結合蛋白質の精製を試み、Munc13-4 を同定した。Munc13-4 は神経伝達物質の放出に必須の因子 Munc13-1 の非神経型ホモログであった。濃染顆粒の分泌はリコンビナント Munc13-4 により増強され、抗 Munc13-4 抗体により抑制された。以上の結果より、血小板濃染顆粒の分泌は低分子量 G 蛋白質 Rab27、およびそのエフェクター分子 Munc13-4 により制御されることが明らかとなった。本研究は、血小板活性化に重要な役割を担う濃染顆粒分泌の分子機構を明らかにしたもので、今後の血小板活性化機構の解明、抗血栓治療への応用へ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22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。