氏名	川戸充徳（かわと みつのり）
学位（専攻分野）	博士（医学）
学位記番号	医博第3188号
学位授与の日付	平成20年3月24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	Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-Exocyst pathway （低分子量GTP結合蛋白質RalとExocyst複合体による血小板濃染顆粒放出の制御）
論文調査委員	（主査） 教授 成宮 周　教授 長田重一　教授 三嶋理晃

論文内容の要旨

血小板中には特異的な顆粒が存在し、これらは血小板の活性化に伴い細胞外へ放出される。この顆粒放出は、血小板の止血機能に必須の役割を担っており、顆粒の欠損や放出の異常により出血傾向を呈する。中でも濃染顆粒は、ADPやセロトニンなどの血小板自身に作用するアゴニストを高密度に含有しており、これらが放出されると、ポジティブフィードバック機構によって周囲の血小板活性化が連鎖的に進行するものと考えられている。

血小板には核が無く、蛋白を細胞内で産生することがほとんどできない。よって遺伝子過剰発現実験等の分子生物学的・生化学的手法を血小板の研究に応用することは困難である。そこで細菌毒素streptolysin-Oによる膜透過型血小板を用いて顆粒放出を解析するアッセイ系を確立し、いくつかの重要分子を同定してきた。

血小板では、細胞内Ca^{2+}濃度上昇が、顆粒放出や形態変化・凝集など一連の反応を引き起す主な誘因となる。しかし膜透過型血小板では、細胞内Ca^{2+}上昇がなくとも、非水解性GTPアナログによって血小板顆粒放出が誘導されることが以前より知られていた。この分子メカニズムを検討するため、Rasファミリーに属する低分子量GTP結合蛋白質Ralに注目した。Ralは、エンドサイトーシスや腫瘍形成等を制御する多機能蛋白である。血小板中に豊富に発現し、様々なアゴニスト刺激により急速にGDP結合型からGTP結合型に変換されること、またtethering factorとして知られるExocyst複合体を標的蛋白とし、ほ乳類においてエキソサイトーシスを制御していることが報告されていたが、血小板におけるRalの機能は未解明であった。またGTP結合型Ralは、Exocyst複合体とそのコンポーネントであるSec5を介して結合することが知られていた。

まずCa^{2+}上昇を伴わない状態で、非水解性GTPアナログであるGppNHpにより膜透過型血小板を刺激し、濃染顆粒放出がRalの活性化と同じ時間経過で誘発されることを顆粒放出アッセイおよびRalのプルダウンアッセイにて確認した。そして、GTP結合型Ralと特異的に結合するSec5のRal結合ドメイン（Sec5-RBD）をリコンビナント蛋白として作成し、膜透過型血小板に加えた所、GppNHp誘発性濃染顆粒放出は濃度依存的に抑制された。次にExocyst複合体とGTP結合型Ralの結合をin vitroで抑制するSec5-RBDに対する抗体を作成した。この抗体を膜透過型血小板に加えると、GppNHp誘発性濃染顆粒放出は濃度依存的に抑制された。これらの結果より、膜透過型血小板におけるGppNHp誘発性濃染顆粒放出は、Ral-Exocyst経路が制御しているものと考えられた。

さらにRal-Exocyst経路が生理的な系においても機能を担っているかどうかを探求し、Ralが膜透過型血小板のCa^{2+}に対する感受性を増強することを見出した。そして洗浄血小板を生理的なアゴニストであるトロンビンにより刺激した際も、RalとExocyst複合体との結合が、濃染顆粒放出およびRalの活性化と同じ時間経過で引き起されていることを免疫沈降実験によって証明した。また、血栓形成中の活性化血小板の細胞内Ca^{2+}濃度は0.2〜2μMと幅があり、その大部分が1μM以下であることが報告されている。以上を総合的に考慮すると、生理的な状況下では、Ralは細胞内Ca^{2+}濃度が1μM以下の準最大活性化血小板において、Ca^{2+}に対する感受性を増加させることにより濃染顆粒放出を制御している可能性がある。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

活性化血小板は濃染顆粒の開口放出により、血小板アゴニストであるADPやセロトニンを放出し、血栓形成に寄与する。細胞内Ca^{2+}濃度上昇が顆粒放出の主な誘因となるが、形質膜透過型血小板では細胞内Ca^{2+}上昇がなくとも、非水解性GTPアナログであるGppNHpにより顆粒放出が誘導されることが知られていた（Haslam, R. J., and Davidson, M. M. （1985） Nature. 313, 821-822）。本研究において、透過型血小板におけるGppNHp誘発性濃染顆粒放出は、低分子量GTP結合蛋白Ralおよび、その標的蛋白でありtethering factorとして知られているExocyst複合体が、本顆粒放出のCa^{2+}に対する感受性を増強することにより、誘導していることが証明された。さらに、単離された血小板において、トロンビン刺激はRalの活性化を引き起こし、RalとExocyst複合体との会合を伴うことも示された。実験的血栓形成モデルにおいて、活性化血小板の細胞内Ca^{2+}濃度は0.2〜2μMと幅があり、その大部分が1μM以下であることが報告されている（Nesbitt, W. S., and Jackson, S. P. （2003） *J. Cell Biol*. **160**, 1151-1161）。顆粒放出誘導のためには、［Ca^{2+}］単独では1μM以上の濃度が必要であることから、Ral-exocyst複合体系は細胞内Ca^{2+}濃度が1μM以下の弱く活性化した血小板において、濃染顆粒放出を制御している可能性が考えられる。

以上の研究は、長年の課題であった血小板の濃染顆粒分泌制御の分子機構を明らかにしたもので、血栓止血学および細胞生物学（細胞内小胞輸送の分子機構解明）に寄与するところが大きい。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認められる。

なお、本学位授与申請者は、平成20年1月16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。