◆ 総 説 ◆

血小板顆粒放出の分子メカニズム

川戸 充徳*, 白川 龍太郎*, 北 徹*,
堀内 久徳*

Molecular mechanism of platelet granule secretion

Mitsunori KAWATO*, Ryutaro SHIRAKAWA*, Toru KITA*,
Hisanori HORIUCHI*

Key words: platelet, granule secretion, SNARE, small GTPase, protein
kinase C

川戸 充徳

平成11年 3 月 岡山大学医学部医学科卒業
平成11年 6 月 神戸市立中央市民病院（内
科研修医）
平成13年 6 月 神戸市地域医療振興財団
西神戸医療センター（循環
器科専攻医）
平成16年 4 月 京都大学大学院医学研究科
博士課程（内科系専攻循環
器内科）

はじめに

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。近年の顆粒と形質膜との膜融合の分子メカニズムに関する研究の発展は著しく、また顆粒の放出を制御している仕組みも解明されてきた。本稿では我々の研究室で得られたデータを含めて、最新の知見を述べる。

1. 血小板顆粒の種類と放出の意義

血小板は主に3種類の顆粒を有しており、それぞれ形態や内容物、放出様式が異なっている¹⁾。以下に各顆粒の特徴とそれらの放出の意義を述べる。

1) α 顆粒

α 顆粒は血小板中で最も大きく（200–500 nm）、また最も多く存在（約80個/細胞）している²⁾³⁾。 α 顆粒に含まれる物質は概ねペプチ

ドや蛋白質であるが、血小板には蛋白合成能がほとんどないため、これらは巨核球で産生されて受け継いだものか、血小板の形質膜からエンドサイトーシスで取り込まれたものである⁴⁾。具体的には、血小板由来成長因子（PDGF）などの成長因子、von Willebrand 因子やビトロネクチンなどの可溶性接着因子、フィブリノゲンや凝固第V因子などの凝固因子、その他血小板特異蛋白である血小板第4因子（PF4）や β トロンボグロブリン等、多くの生理活性物質が α 顆粒内に存在している。

また α 顆粒膜上にはP-セレクチンやインテグリン α IIb β 3（GPIIb/IIIa）などの接着分子が存在する。血小板の活性化に伴い顆粒が形質膜と融合すると、これらの接着分子が形質膜表面に移動して機能を発揮すると同時に、細胞の表面積を拡大させることで血小板凝集や粘着に寄与する¹⁾。

2) 濃染顆粒

濃染顆粒は、 α 顆粒より小さく（200–300 nm）、血小板中に数個（約3–9個/細胞）存在しており⁵⁾、ADPやATP、セロトニン、カルシ

*京都大学大学院医学研究科循環器内科学〔〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54〕

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University [54 Kawahara-cho, Shogoin, sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan]

Tel: 075-751-3778 Fax: 075-751-3203 e-mail: horiuchi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

ウム等の小分子を高密度に含有している。ADP は $P2Y_1$ レセプターや $P2Y_{12}$ レセプターを介して血小板自身のアゴニストとして作用し、周囲の血小板を活性化させる⁶⁾。セロトニンは、血管を収縮させる作用のほか、血小板に対するアゴニストとしても機能する。このように濃染顆粒には血小板自身に作用するアゴニストが詰まっており、これらが放出されることで、ポジティブフィードバック機構により周囲の血小板活性化が連鎖的に進むものと考えられる⁷⁾。なお、濃染顆粒の膜上には、リソソームの膜抗原である LAMP-3 (CD63, granulophysin, LIMP-1) が豊富に存在するため、濃染顆粒は Lysosome-related organelle として位置付けられている⁸⁾。

3) リソソーム

リソソームは直径約 200 nm の小顆粒で、その数は非常に少ない⁹⁾¹⁰⁾。膜上にはリソソームの共通膜蛋白 LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3 (CD63) を有し、顆粒中にはカテプシンや β ヘキソサミニダーゼなどの加水分解酵素を含んでいる。これらの放出は、*in vivo* でも *in vitro* でも検出可能であり¹¹⁾¹²⁾、形成中の凝血塊に捕捉された血小板の活性化や傷害された血管のリモデリングに寄与するなどと考えられているが、生理的な意義を明らかにした報告はない¹²⁾¹³⁾。

2. 血小板顆粒放出研究の方法

血小板には核が無く、蛋白を細胞内で産生することができないため、遺伝子の過剰発現実験や RNAi などの分子生物学的・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。そのため、血小板の活性化や顆粒放出のメカニズムの研究は、主として細胞膜透過性の小分子阻害剤等を用いた薬理的な解析に留まっていたが、近年、有力な分子のノックアウトマウスにおける血小板の研究が進んでいる。例えば、三量体 G 蛋白質 Gq の α サブユニットをノックアウトしたマウスの出血時間は延長し、コラーゲンやアドレナリンによる血栓症が生じな

い¹⁴⁾。また最近、巨核球に特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスが作成され、血小板特異的蛋白質 PF4 のプロモーターと Cre-loxP システムを利用して、巨核球の任意の遺伝子を不活化させることが可能となった¹⁵⁾。この方法により、普遍的に発現している蛋白でも血小板でのみ欠損させる事が可能となり、血小板形成や血小板機能の解析のツールとして今後の有用性が期待される。しかし遺伝子改変マウスを使用する手法は、対象が既知の蛋白質に限られ、また多大の労力を必要とする。このような状況下、形質膜を透過型にした血小板を用いて、凝集反応¹⁶⁾や顆粒放出¹⁷⁾¹⁹⁾の解析が行われるようになった。この方法は形質膜が透過型であるので、遺伝子操作した分子や特異抗体を外部から導入でき、多くの因子を簡便に解析することが可能である。我々も、細菌毒素 streptolysin-O (SLO) による膜透過型血小板を用いた顆粒放出²⁰⁾²⁴⁾および凝集反応²⁵⁾²⁶⁾の解析系を確立し、いくつかの重要分子を同定した。まず我々の顆粒放出アッセイ系を簡単に紹介する。

・膜透過型血小板を用いたセミンタクト顆粒放出アッセイ (図 1)²⁴⁾

この方法は、主に 4 つのステップから成る。

1) まず新鮮な洗浄血小板を精製し、 $[^3\text{H}]$ 5-hydroxytryptamine (5-HT, セロトニン) とインキュベートして濃染顆粒に取り込ませる。

2) SLO により形質膜を透過型にする。

3) この操作により約 30 nM の多数の小さい穴が開き、約 400 kDa 以下の蛋白は流出するため、反応性を維持するため外部より ATP と血小板細胞質を、そしてリコンビナント蛋白や阻害抗体など機能を調べたい物質を加える。

4) 最後にカルシウムを加えて 30°C で刺激することで血小板を活性化させ、顆粒から放出されて上清に出てきた $[^3\text{H}]$ セロトニンをシンチレーションカウンターで検出して濃染顆粒放出とする。

図1 膜透過型血小板を用いたセミンタクト顆粒放出アッセイ法

3. 膜融合のメカニズム

電子顕微鏡による研究において、血小板の顆粒放出は、他の細胞と基本的に異なる様式であることが示されている。血小板には、開放小管系 (open canicular system ; OCS) と呼ばれる形質膜表面から内部へと続くユニークな管状構造物が存在する²⁷⁾。血小板が活性化されると、細胞内顆粒は中心部へたぐり寄せられ、顆粒とOCSおよび顆粒同士が融合して拡張した管腔を形成し、この管腔を通じて顆粒内容物が外部へ放出される^{28) 29)}。また、他の顆粒分泌細胞と同様、形質膜への融合も観察される^{30) 31)}。

血小板の顆粒放出反応は、シナプスでの神経伝達物質の放出や内分泌細胞におけるホルモン分泌と基本的に同様の分子機構を用いて行われていると考えられている (図2)^{32) 33)}。しかしそれぞれの細胞では、刺激を受けてから放出に至るまでの時間経過が異なり、また細胞ごとに異なるメカニズムが存在することも明らかとなっている。

細胞内での物質輸送は、主に小胞輸送というメカニズムで行われている。小胞の輸送が間違わずに行われるためには、輸送小胞が癒合相手となる標的膜を正しく認識しなければならないが、その標識となるのがSNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) である^{34) 37)}。小胞側には

vesicle 側の SNARE、いわゆる v-SNARE が1種類、標的膜側には target 側の SNARE、つまり t-SNARE が2種類存在しており、小胞と標的膜の癒合の際の特異性を保証している。哺乳類では、v-SNARE は VAMP (vesicle associated membrane protein)/synaptobrevin、t-SNARE は syntaxin および SNAP23/25 (soluble NSF attachment protein) であり、組織によって用いられている SNARE 蛋白の種類の組み合わせが異なっている。

また、これらは SNARE 複合体を形成し、融合を触媒する中心的な働きも担っている。SNARE 複合体は、膜貫通蛋白である v-SNARE の VAMP/synaptobrevin および t-SNARE の syntaxin から α ヘリックス構造を1本ずつ、また膜表面に存在している t-SNARE の SNAP23/25 から α ヘリックス構造を2本提供され、全体として4本のハンドル構造をとっている。SNARE 複合体が形成されると、ヘリックスが互いに巻き付き、SNARE が巻き上げ機のように働いて膜面を引き寄せて融合を生じ、内容物を放出させると考えられている。

血小板においては、VAMP3、8³⁸⁾、SNAP-23^{39) 41)}、syntaxin 2、4、7^{39) 42)} が同定されており、このうち VAMP3 と SNAP-23 および syntaxin 4 が複合体を形成することが示されている³⁹⁾。 α 顆粒では syntaxin 2 と 4 が、濃染顆粒では syntaxin 2 が放出を制御しているとき

図2 血小板顆粒が標的膜と融合する過程の模式図

1) Recruitment: 顆粒が標的膜近傍に輸送されてくる段階. 細胞骨格系の関与が考えられている. 2) Tethering/Docking: やや定義があいまいであるが, 顆粒が標的膜と形態的に接している段階. SNARE 関連蛋白の Munc18 が syntaxin と結合していることによって, SNARE 複合体が形成されるのを妨げていると考えられている. 3) Priming: 刺激に応じて迅速に顆粒を放出するための準備段階. Munc13 ファミリーの関与が知られている. 4) Fusion: 細胞内カルシウム濃度上昇に反応して, 形成された SNARE 複合体が完全に巻き上げられることで膜同士が融合し, 顆粒内容物が外部へ放出される段階.

れているが^{41) 43)}, これらは中和抗体を膜透過型血小板に加えて放出が抑制されたという実験のみからの知見であり, 確定するためにはさらに詳細な解析が必要と思われる.

4. 血小板顆粒放出の制御

我々は, 膜透過型血小板による顆粒放出アッセイを用いて, 主に血小板濃染顆粒放出の分子メカニズムの解明を進めている. 現在までに, 濃染顆粒放出に関与する重要分子をいくつか同定し, 細胞内シグナル伝達物質であるカルシウムイオンの下流の2つの経路, つまり PKC α を介する経路と Rab 27/Munc13-4 を介する経路を見出した (図3).

1) 血小板の活性化と細胞内カルシウム上昇

血小板は, トロンビンやトロンボキサン A2, コラーゲン, ADP, セロトニンなど様々なアゴニストの受容体を持ち, それらによって活性化される. 静止時の血小板の細胞内カルシウムイ

オン濃度は約 10 nM と低値に保たれているが, 活性化に伴い最高数 μ M 以上にまで上昇する. 血小板においては, この細胞内カルシウムイオン濃度上昇がセカンドメッセンジャーとして, 顆粒放出^{44) 45)}や形態変化, 凝集など一連の反応を引き起す主な引き金となる.

2) 低分子量 GTP 結合蛋白質 (small GTPase)

低分子量 G 蛋白質は, 細胞内シグナル伝達物質の基本因子の一つである. GDP と結合している時は不活性型, GTP と結合している時は活性型であり, この GTP 結合型が, 特異的なエフェクター蛋白と結合して機能を発揮する.

低分子量 G 蛋白質に属する Rab ファミリーは, 現在までに約 60 種類以上が知られており, それぞれ特異的な細胞内小器官に存在して, SNARE 蛋白と同様, 小胞輸送に重要な役割を担っている^{46) 47)}. GDP 結合型 Rab は, RabGDI (GDP-dissociation inhibitor) と結合して細胞質に存在している. 膜上の GDI (GDI dissociation

図3 濃染顆粒放出の制御システム

factor) によって GDP 結合型から GTP 結合型に変換されると、尾部の脂質アンカーを介して輸送小胞へ結合し、次いで、標的膜上の Rab エフェクターと結合することで膜同士を融合させて顆粒を放出させる^{48) 49)}。このように Rab とそのエフェクターは、小胞と標的膜の接着を助け、SNARE の適合を促進、調節していると考えられている。血小板中には Rab1A, 1B, 3B, 4, 5, 6, 8, 11, 27A, 27B, 31 が存在することが示されており、このうち Rab3B, 6, 8 が血小板活性化に伴いリン酸化される¹³⁾。

我々は、ドミナントネガティブの Rab4 をセミンタクト顆粒放出アッセイに加えると、濃染顆粒放出には影響を認めないが、 α 顆粒放出が強く抑制される所見より、Rab4 は α 顆粒放出の制御因子であると報告した²⁰⁾。また同様に、脂質修飾されていない Rab27 をリコンビナント蛋白として作成し、膜透過型血小板の顆粒放出アッセイに加えた所、カルシウム依存性濃染顆粒放出が抑制された所見より、Rab27 が血小板濃染顆粒放出に関与していることも見出した²³⁾。Rab27A は、皮膚や毛髪の色化と重度の免疫不全を呈するヒト遺伝病 Griscelli 症候群の原因遺伝子であり、メラノソームの輸送⁵⁰⁾ と細胞傷害性 T 細胞における lytic granule の放

出⁵¹⁾を制御していることが明らかとなっている。さらに我々は、Rab27A のエフェクター蛋白として Munc13-4 を血小板細胞質から同定し、Rab27 が Munc13-4 を介して、血小板におけるカルシウム依存性濃染顆粒放出を制御していることも報告した (図3)²³⁾。Munc13-4 は、神経細胞におけるプライミング因子である Munc13-1 のホモログであり、この Munc13-1 は、グルタミン酸作動性ニューロンにおける神経伝達物質の放出に不可欠な存在である^{52) 53)}。ヒト Munc13-4 は、神経系以外の組織に発現しており、Munc13-1 と同様、二つの Ca 結合ドメイン (C2 ドメイン) を持つ⁵⁴⁾。Munc13-4 は、血球系細胞における調節性開口放出の general regulator であり、その異常は家族性血球貪食症候群 3 型の原因となり、これらの患者の細胞傷害性 T 細胞では、lytic granule の放出が障害されている⁵⁵⁾。大部分の低分子量 G 蛋白質は、静止時に GDP 結合型 (不活性化型) を呈し、細胞外刺激に応じて GTP 結合型 (活性化型) となってスイッチ機能を発揮する。しかし我々は、静止時の血小板において、既に Rab27 の大部分が GTP 結合型 (活性化型) であること、そして顆粒放出に伴って GTP が加水分解されて GDP 結合型 (不活性化型) となることを報告した⁵⁶⁾。膜透過型血小板に外部から加水分解さ

れない GTP アナログを加えて, つまり GTP 結合型 Rab27 が加水分解されない状態においても, カルシウムによる刺激で濃染顆粒放出を生じたことより, Rab27 に結合した GTP の加水分解は顆粒放出の誘発に必須ではないと考えられ, 静止時に Rab27 が活性型に保たれていることは濃染顆粒放出の準備状態の維持に重要な働きを担っていると結論した. 最近, Rab27B ノックアウトマウスでは, 血小板濃染顆粒数が約半分に減少しており, 濃染顆粒放出も抑制されていることが報告された⁵⁷⁾. これらのノックアウトマウスの α 顆粒の形態および機能には影響がないことから, Rab27B は濃染顆粒放出を特異的に制御していると考えられる.

膜透過型血小板では, カルシウムイオンの上昇がなくとも, 非水解性 GTP アナログが血小板顆粒放出を誘導することが以前より知られていた^{17) 58)}. Ras ファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白 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⁵⁹⁾. Ral は血小板中に豊富に発現しており, 様々なアゴニスト刺激によって急速に 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る^{59)–61)}. それ故に我々は Ral に注目し, Ral と exocyst 複合体が, 膜透過型血小板における GTP 依存性濃染顆粒放出を制御していること, そして膜透過型血小板のカルシウムイオンに対する感受性を増強することを見出した⁶²⁾. 血栓形成中の活性化血小板の細胞内カルシウムイオン濃度は $0.2\sim 2\ \mu\text{M}$ と幅があり, その大部分が $1\ \mu\text{M}$ 以下であることが報告されている⁶³⁾. よって Ral は, 生理的な状況下では, 細胞内カルシウムイオン濃度が $1\ \mu\text{M}$ 以下の準最大活性化血小板において, カルシウム感受性を変化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.

3) プロテインキナーゼ C (protein kinase C ; PKC)

膜透過型血小板を用いたカルシウム依存性顆粒放出アッセイ系では, 細胞質成分を外部から補充することが必須であり, 血小板顆粒放出には細胞質中の何らかの因子が必要であると考えられた. そこで我々は, 細胞質成分に含まれる α 顆粒および濃染顆粒放出の必須因子を生化学的に精製して解析し, PKC α を同定した (図 3)²²⁾. PKC α は C2 ドメインを持ち, カルシウムやリン脂質であるフォスファチジルセリン, ジアシルグリセロールによって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである.

SNARE 関連蛋白である Munc18-1 は, ニューロンにおいて, t-SNARE である syntaxin1 の不活性型 (closed conformation) と結合し, syntaxin1 と非刺激時の SNAP25 との結合を阻害することで, むやみに SNARE 複合体を形成するのを防ぎ, 顆粒放出を制御していると考えられている⁶⁴⁾. 静止時の血小板においても同様に, そのホモログである Munc18c と syntaxin4 とが結合しているが, Munc18c は PKC によってリン酸化されると, そのリン酸化によって syntaxin4 との親和性が減弱することが報告されている^{40) 65) 66)}. PKC による Munc18c のリン酸化によって Munc18c が離れた syntaxin は, 他の SNARE 蛋白と相互作用ができるようになり, 顆粒放出を促進するのではないかと考えられている. また, 活性化した血小板において, SNARE 蛋白である syntaxin4 や SNAP23 も同様に, PKC によってリン酸化されることが示されているが, 生理的な意義についてまでは言及されていない^{67) 68)}.

4) その他の因子

血小板の形態変化に伴って顆粒は血小板の中心部へ移動するが, これは血小板の活性化と同時に起こり, 顆粒放出よりも先行するため, 細胞骨格系の再構成が顆粒放出の制御に関与している可能性がある. 細胞骨格系が顆粒放出の制御に関与するかどうかの報告には, 肯定するも

のと否定するものが存在する⁶⁹⁾⁻⁷³⁾。最近も、細胞骨格系の阻害物質であるラトランキュリン A やサイトカラシン E で処理した血小板を用いた実験で、静止時の細胞骨格系は血小板顆粒放出を抑制するバリアとして機能しており、さらに α 顆粒と濃染顆粒放出を別個に制御していることが報告されている⁷⁴⁾。

またアクチン結合蛋白の一つである MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) は、リン酸化されていない状態では、膜上の PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) と強固に結合しており、PIP2 が PLC (phospholipase C) によって分解されるのを妨げている。PKC によって MARCKS がリン酸化されると、PIP2 との親和性が低下するため⁷⁵⁾⁻⁷⁷⁾、PIP2 の分解を介して、細胞の表面下に存在して顆粒放出を抑制しているアクチンバリアの分解に寄与している可能性がある⁷⁸⁾。

II 型の PIPK (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-kinase) も PKC の基質であるが、PKC による II 型 PIPK の細胞質から形質膜細胞質側への移動と PIP2 の合成が α 顆粒放出に必要なであるとする報告もある^{79) 80)}。

おわりに

血小板の顆粒放出は、血小板の止血機能に必須の働きを担っている。ADP 受容体 P2Y₁₂ 阻害薬チクロピジンやクロピドグレル、またセロトニン受容体拮抗薬のサルボグレラートなどは抗血小板薬として臨床の場で使用されているが、これら ADP やセロトニンの供給源は濃染顆粒である。膜透過型血小板を用いた研究などにより、顆粒放出メカニズムの解明は急速に進行しているものの、不明な部分も多い。今後の顆粒放出分野の更なる発展と、それに伴う新薬や新たな治療法の開発に期待したい。

文 献

- 1) Brass LF : The molecular basis for platelet activation, 4th ed. New York, Elsevier, 2005.
- 2) Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ : Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol.* **169** : 301-311, 1989.
- 3) Harrison P, Savidge GF, Cramer EM : The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br J Haematol.* **74** : 125-130, 1990.
- 4) King SM, Reed GL : Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol.* **13** : 293-302, 2002.
- 5) White JG : The dense bodies of human platelets : Inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood.* **33** : 598-606, 1969.
- 6) Dorsam RT, Kunapuli SP : Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest.* **113** : 340-345, 2004.
- 7) Horiuchi H : Recent advance in antiplatelet therapy : The mechanisms, evidence and approach to the problems. *Ann Med.* **38** : 162-172, 2006.
- 8) Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS : Lysosome-related organelles. *Faseb J.* **14** : 1265-1278, 2000.
- 9) Menard M, Meyers KM, Prieur DJ : Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb Haemost.* **63** : 127-132, 1990.
- 10) Rendu F, Brohard-Bohn B : The platelet release reaction : Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* **12** : 261-273, 2001.
- 11) Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresle P : Platelets release their lysosomal content *in vivo* in humans upon activation. *Thromb Haemost.* **83** : 157-164, 2000.
- 12) Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW : Molecular mechanisms of platelet exocytosis : Role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood.* **96** : 1782-1788, 2000.
- 13) Flaumenhaft R : Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23** : 1152-1160, 2003.
- 14) Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI : Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* **389** : 183-186, 1997.
- 15) Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC : Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function *in vivo*. *Blood* **109** : 1503-1506, 2007.
- 16) Chiang TM : Collagen-induced platelet aggregation and release reaction : Role of ras protein. *Thromb Res.* **88** : 205-213, 1997.
- 17) Padfield PJ, Panesar N, Henderson P, Baldassare JJ : Differential effects of G-protein activators on 5-hydroxytryptamine and platelet-derived growth factor release from streptolysin-O-permeabilized human platelets. *Biochem J.* **314** : 123-128, 1996.
- 18) Sloan DC, Haslam RJ : Protein kinase C-dependent and Ca²⁺-dependent mechanisms of secretion from streptolysin O-permeabilized platelets : Effects of leakage of cytosolic proteins. *Biochem J.* **328** : 13-21, 1997.
- 19) Fitzgerald ML, Reed GL : Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by a protein kinase

- C-dependent mechanism : Effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem J.* **342** : 353–360, 1999.
- 20) Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T : Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* **275** : 33844–33849, 2000.
 - 21) Yoshioka A, Horiuchi H, Shirakawa R, Nishioka H, Tabuchi A, Higashi T, Yamamoto A, Kita T : Molecular dissection of alpha- and dense-core granule secretion of platelets. *Ann N Y Acad Sci.* **947** : 403–406, 2001.
 - 22) Yoshioka A, Shirakawa R, Nishioka H, Tabuchi A, Higashi T, Ozaki H, Yamamoto A, Kita T, Horiuchi H : Identification of protein kinase Calpha as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca²⁺-induced alpha- and dense-core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* **276** : 39379–39385, 2001.
 - 23) Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Yoshioka A, Nishioka H, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H : Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* **279** : 10730–10737, 2004.
 - 24) Shirakawa R, Higashi T, Kondo H, Yoshioka A, Kita T, Horiuchi H : Purification and functional analysis of a Rab27 effector munc 13-4 using a semi-intact platelet dense-granule secretion assay. *Methods Enzymol.* **403** : 778–788, 2005.
 - 25) Tabuchi A, Yoshioka A, Higashi T, Shirakawa R, Nishioka H, Kita T, Horiuchi H : Direct demonstration of involvement of protein kinase Calpha in the Ca²⁺-induced platelet aggregation. *J Biol Chem.* **278** : 26374–26379, 2003.
 - 26) Nishioka H, Horiuchi H, Tabuchi A, Yoshioka A, Shirakawa R, Kita T : Small GTPase Rho regulates thrombin-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* **280** : 970–975, 2001.
 - 27) White JG, Clawson CC : The surface-connected canalicular system of blood platelets—a fenestrated membrane system. *Am J Pathol.* **101** : 353–364, 1980.
 - 28) Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF : Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol.* **98** : 748–760, 1984.
 - 29) Escolar G, White JG : The platelet open canalicular system : a final common pathway. *Blood Cells.* **17** : 467–485, 1991.
 - 30) Ginsberg MH, Taylor L, Painter RG : The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood* **55** : 661–668, 1980.
 - 31) Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H : The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol.* **43** : 273–282, 1987.
 - 32) Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J : Molecular mechanisms of platelet exocytosis : insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* **96** : 3334–3342, 2000.
 - 33) Burgoyne RD, Morgan A : Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* **83** : 581–632, 2003.
 - 34) Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE : A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* **75** : 409–418, 1993.
 - 35) Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE : SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362** : 318–324, 1993.
 - 36) Jahn R, Sudhof TC : Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* **68** : 863–911, 1999.
 - 37) Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT : Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395** : 347–353, 1998.
 - 38) Polgar J, Chung SH, Reed GL : Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* **100** : 1081–1083, 2002.
 - 39) Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, Furie B, Furie BC : Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4. *J Biol Chem.* **274** : 2492–2501, 1999.
 - 40) Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML : Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation : implications for platelet secretion. *Blood* **93** : 2617–2626, 1999.
 - 41) Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW : Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood* **95** : 921–929, 2000.
 - 42) Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW : Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* **90** : 1490–1500, 1997.
 - 43) Lemons PP, Chen D, Whiteheart SW : Molecular mechanisms of platelet exocytosis : Requirements for alpha-granule release. *Biochem Biophys Res Commun.* **267** : 875–880, 2000.
 - 44) Rink TJ, Smith SW, Tsien RY : Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets : Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett.* **148** : 21–26, 1982.
 - 45) Knight DE, Hallam TJ, Scrutton MC : Agonist selectivity and second messenger concentration in Ca²⁺-mediated secretion. *Nature* **296** : 256–257, 1982.
 - 46) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T : Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81** : 153–208, 2001.
 - 47) Zerial M, McBride H : Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2** : 107–117, 2001.
 - 48) Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M : Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368** : 157–160, 1994.
 - 49) Soldati T, Shapiro AD, Svejstrup AB, Pfeffer SR : Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369** : 76–78, 1994.
 - 50) Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC : Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol.* **152** : 795–808, 2001.
 - 51) Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM : Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* **152** : 825–834, 2001.
 - 52) Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J : Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J.* **19** : 3586–3596, 2000.
 - 53) Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC, Brose N : Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* **400** : 457–461, 1999.
 - 54) Koch H, Hofmann K, Brose N : Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel

- ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J.* **349** : 247–253, 2000.
- 55) Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachee-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G : Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* **115** : 461–473, 2003.
 - 56) Kondo H, Shirakawa R, Higashi T, Kawato M, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H : Constitutive GDP/GTP exchange and secretion-dependent GTP hydrolysis activity for Rab27 in platelets. *J Biol Chem.* **281** : 28657–28665, 2006.
 - 57) Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC : Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104** : 5872–5877, 2007.
 - 58) Haslam RJ, Davidson MM : Guanine nucleotides decrease the free $[Ca^{2+}]$ required for secretion of serotonin from permeabilized blood platelets. Evidence of a role for a GTP-binding protein in platelet activation. *FEBS Lett.* **174** : 90–95, 1984.
 - 59) Feig LA : Ral-GTPases : approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol.* **13** : 419–425, 2003.
 - 60) Mark BL, Jilkina O, Bhullar RP : Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules. *Biochem Biophys Res Commun.* **225** : 40–46, 1996.
 - 61) Wolthuis RM, Franke B, van Triest M, Bauer B, Cool RH, Camonis JH, Akkerman JW, Bos JL : Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Mol Cell Biol.* **18** : 2486–2491, 1998.
 - 62) Kawato M, Shirakawa R, Kondo H, Higashi T, Ikeda T, Kita T, Horiuchi H : Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-Exocyst pathway. *J Biol Chem.* (in press)
 - 63) Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP : Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol.* **160** : 1151–1161, 2003.
 - 64) Toonen RF, Verhage M : Vesicle trafficking : Pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* **13** : 177–186, 2003.
 - 65) Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH, Takai Y : Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C : Its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem.* **271** : 7265–7268, 1996.
 - 66) Hough A, Polgar J, Reed GL : Munc18-syntaxin complexes and exocytosis in human platelets. *J Biol Chem.* **278** : 19627–19633, 2003.
 - 67) Chung SH, Polgar J, Reed GL : Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem.* **275** : 25286–25291, 2000.
 - 68) Polgar J, Lane WS, Chung SH, Hough AK, Reed GL : Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets. *J Biol Chem.* **278** : 44369–44376, 2003.
 - 69) Haslam RJ, Davidson MM, McClenaghan MD : Cytochalasin B, the blood platelet release reaction and cyclic GMP. *Nature* **253** : 455–457, 1975.
 - 70) Kirkpatrick JP, McIntire LV, Moake JL, Cimo PL : Differential effects of cytochalasin B on platelet release, aggregation and contractility : Evidence against a contractile mechanism for the release of platelet granular contents. *Thromb Haemost.* **42** : 1483–1489, 1980.
 - 71) Cox AC : Cytochalasin E enhances the protein kinase C-dependent process of secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* **150** : 745–751, 1988.
 - 72) Hashimoto K, Kawarabayashi K, Hashimoto K, Tatsumi N : Inhibition of platelet secretion of ATP by phalloidin. *Cell Biol Int Rep.* **10** : 41–47, 1986.
 - 73) Yatomi Y, Higashihara M, Tanabe A, Ohashi T, Takahata K, Kariya T, Kume S : Separable function of platelet release reaction and clot retraction. *Biochem Biophys Res Commun.* **140** : 329–334, 1986.
 - 74) Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM : The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood* **105** : 3879–3887, 2005.
 - 75) Wang J, Arbuzova A, Hangyas-Mihalyne G, McLaughlin S : The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* **276** : 5012–5019, 2001.
 - 76) Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM : Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS : A MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood* **95** : 894–902, 2000.
 - 77) Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G : Cross-talk unfolded : MARCKS proteins. *Biochem J.* **362** : 1–12, 2002.
 - 78) Trifaro JM, Lejen T, Rose SD, Pene TD, Barkar ND, Seward EP : Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion. *Neurochem Res.* **27** : 1371–1385, 2002.
 - 79) Rozenvayn N, Flaumenhaft R : Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet alpha-granule secretion. *J Biol Chem.* **278** : 8126–8134, 2003.
 - 80) Rozenvayn N, Flaumenhaft R : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates Ca^{2+} -induced platelet alpha-granule secretion : Evidence for type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase function. *J Biol Chem.* **276** : 22410–22419, 2001.