

表4 DSM-IVにおけるせん妄の診断基準

- 
- A. 注意を集中し、維持し、転換する能力の低下を伴う意識の障害(すなわち環境認識における清明度の低下).
- B. 認知の変化(記憶欠損, 失見当識, 言語の障害など), またはすでに先行し, 確定され, または進行中の痴呆ではうまく説明されない知覚障害の発現.
- C. その障害は短期間のうちに出現し(通常数時間から数日), 1日のうちで変動する傾向がある.
- D. 病歴, 身体診察, 臨床検査所見から, その障害が一般身体疾患の直接的な生理学的結果により引き起こされたという証拠がある.
- 

数時間ないし数日と規定している(表4)”。

#### 4. 重症度

---

認知機能障害の程度は連続的あるいは階段状に変化するものであり, 特に軽症例では, 痴呆の有無のみならず, その程度を知ることが重要である。患者の治療方針の決定, 臨床研究, 薬剤の治験にあたっては, 痴呆の重症度は重要である。DSM-IV, ICD-10にはそれぞれの重症度の基準がある。

Washington University Clinical Dementia Rating (CDR) scaleは認知機能障害と生活機能障害を包括し, 広く用いられているスケールである<sup>2)</sup>。CDRでは記憶, 見当識, 判断と問題解決能力, 社会的行動人格など6つの認知行動領域に対して評価し, その総合点に基づき, 認知機能正常から重症の痴呆まで5段階に分けている。記憶に重点が置かれ, 言語機能が含まれていないなどの問題点が指摘されている。

痴呆は臨床的症候群であり, 病理学的重症度では評価できないが, 臨床的重症度と適切な指標に基づく病理学的重症度とは, 粗い相関がある。

#### 5. 各痴呆性疾患の診断基準

---

Alzheimer病に対するDSM-IV, ICD-10, NINCDS-ADRDAの診断基準を比較すると, 記憶障害, 記憶以外の少なくとも1つの認知機能障害, 病前の機能水準からの著しい低下, 他疾

患の除外, などの項目で一致している。しかし, ICD-10では認知機能障害が6カ月以上と持続時間を規定しており, NINCDS-ADRDAでは‘40-90歳の間に発症し, 65歳以後が最も多い’と発症年齢が記されているが, DSM-IVではこのような制約はない。逆に, NINCDS-ADRDAでは失語, 失認, 失行などの巣症状は記されていない。臨床病理学的に対比した報告では, NINCDS-ADRDAの診断基準の感度と特異性は約80%である。

血管性痴呆の診断基準を上記三者で比較すると, 記憶障害で一致しているのみである。DSM-III-Rでは‘段階的に悪化する経過と記されていたが, DSM-IVでは徐々に進行する例もある’として, この項目は除外されている。ICD-10では経過に関する記載はない。NINDS-AIRENでは, ‘卒中発作後, 3カ月以内に痴呆が発現し, 認知機能の突然または階段状・進行性の低下’と定められている。DSM-IVでは日本人に多い多発性ラクナ梗塞, ビンスワンガー型痴呆が考慮されているのに対し, NINDS-AIRENでは欧米人で圧倒的に多い(日本人でも最近急速に増加しつつあるが)アテローム血栓性脳梗塞および心原性塞栓性梗塞に主眼が置かれている。幾つかの血管性痴呆の診断基準を適用した結果を比較した報告では一致率が極めて低い。画像診断で血管性障害の所見があった場合, それが痴呆の発現にいかなる関係があるかを判断する基準は示されておらず, 事実その判断基準を述べることは困難である。

以上のような診断基準の差異があることは疫学調査, 臨床研究に際して, 十分注意を要する。近年, 脳血管障害の危険因子がAlzheimer病の危険因子でもあるという報告が出つつある。病理学的に血管性病変を伴う例では, Alzheimer病の病理学的変化が軽度でも痴呆を呈するという報告もある。無症候性脳梗塞がある例では, ない例に比べて, 痴呆になるリスクが高い。このような知見はAlzheimer病と血管性痴呆の境界を不鮮明にしつつある。

## おわりに

痴呆に対する診断基準は操作性を目指したものであるが、実際に適用するにあたっては、十分操作的であるとはいえず、利用者の判断に委ねられている部分が多い。例えば、多くの診断基準に、‘仕事、社会的活動、他者との関係が有意に障害される’という項目が含まれているが、患者の職業、ライフスタイルによって認知機能低下が及ぼす程度は著しく異なる。痴呆のスクリーニングテストでは、教育レベルの低い例が得点が低くなる。軽症の痴呆は抑うつ状態、せん妄との鑑別が困難である場合が少なくない。

痴呆という概念は記憶障害を中心とする複数の認知機能の障害を意味し、かつその結果とし

て社会的活動が障害されるという実面的側面がある。痴呆と呼ぶに際して何を重視するかは、研究者あるいは研究グループが置かれた社会、人種、学問的背景によって異なり得る。

グローバリゼーションの中にあつて日本人患者に即した痴呆の診断基準を適用することが今後の重要課題である。痴呆および各痴呆性疾患の診断基準は、我々の認識が変化するとともに変わり得る。そのため、例えば、時代とともに変化する疫学的研究の結果が真に時代的変遷を示しているのか、診断基準が変わったことによるのかを明らかにしがたい場合も少なくない。もしそうであれば、以前の診断基準によればどのような結果であるかを比較し得るような研究結果の提示が望まれる。

## 参考文献

- 1) American Psychiatric Association: Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd ed, revised, American Psychiatric Association, Washington DC, 1987.
- 2) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, 4th ed, American Psychiatric Association, Washington DC, 1994.
- 3) WHO: The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Diagnostic criteria for research, 1993.
- 4) Mckhann G, et al: Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease; Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944, 1984.
- 5) Roman C, et al: Vascular dementia; Diagnostic Criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43: 250-260, 1993.
- 6) Chui HC, et al: Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease and Diagnostic and Treatment Center. *Neurology* 42: 473-480, 1992.
- 7) 今井幸充: せん妄, 痴呆, 健忘および他の認知機能障害. *老年精神医学雑誌* 8: 231-237, 1997.
- 8) Morris JC, et al: The consortium to establish a registry of Alzheimer's disease (CERAD). Part 1. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 39: 1159-1165, 1989.

# Mild cognitive impairment (MCI)

## 治療, 予後

Mild cognitive impairment (MCI)—Treatment and prognosis

高橋 智 柴田俊秀 寺山靖夫 東儀英夫

**Key words:** MCI, 治療, 予後

### はじめに

mild cognitive impairment (MCI) は痴呆に至る前駆症状, あるいは痴呆の preclinical stage を包含する概念として提唱された。痴呆への関心の高まり, 早期治療・予防への期待と相まって, MCI の病態, 予後を含めた疫学, 診断に関する研究が進み, 更にその概念も変化しつつある。

本稿では, 初めに病態の heterogeneity に触れ, MCI の予後, 治療について述べる。

### 1. MCI の heterogeneity

#### a. 臨床症状からみた MCI の多様性

現在, 広く用いられている痴呆の診断基準では, ①記憶障害が存在すること, ②実行機能障害, 失行, 失認, 失語など, 記憶以外のカテゴリーの認知機能障害が少なくとも1つ存在すること, ③認知機能が病前の機能水準から著しく低下することの3項目が, 必須条件としてあげられている。したがって, 記憶障害はあるが, 他のカテゴリーの認知機能障害を伴わない例, また, 認知機能障害はあるが, 機能水準の低下はそれほどでもなく, 日常生活に適応可能な例は, 痴呆と診断されない。

Petersen<sup>1)</sup>は, ①物忘れの訴えがある,

②日常生活動作は保たれている, ③全般的な認知機能は正常に保たれている, ④加齢に伴う記憶障害の範囲を超えた記憶障害が存在する, ⑤痴呆がない, という基準を満たす例を経過観察すると, 毎年10-15%がAlzheimer病(AD)を発症したとして, MCIの概念を提唱した。すなわち, 記憶に選択的な障害を有し, 他の認知機能は保たれていることに重きを置いた概念としてスタートしている。一方, 記憶障害に限らず, ある領域の軽度の認知機能障害の存在を強調した概念として aging-associated cognitive decline (AACD) がある。すなわち, Levy<sup>2)</sup>は, 認知機能低下の訴えがあり, 記憶・学習, 注意・集中, 思考, 言語および視空間認知のいずれかの領域で1標準偏差を下回るが, 痴呆はない例を AACD として提唱している。

近年, Petersen も, MCI の多様性を認め, 近著の中で, 記憶障害を主とする amnesic MCI, 複数の認知領域で障害を有する multiple-domain MCI, 記憶以外の単一領域の認知機能障害を特徴とする non-memory-domain MCI の3つに分けることを提唱している<sup>3)</sup>。

#### b. 病態からみた MCI の多様性

##### 1) MCI にみられる AD の病理・病態

MCI では, 髄液中の総タウ蛋白およびリン酸化タウの増加, 海馬傍回の neurofibrillary tan-

Satoshi Takahashi, Toshihide Shibata, Yasuo Terayama, Hideo Tohgi: Department of Neurology, Iwate Medical University 岩手医科大学神経内科

gleの増加など、AD初期と共通の病態を有することが示されている<sup>4)</sup>。MR volumetryでは嗅内皮質および海馬の萎縮が示されており、PETでは海馬のグルコース代謝の低下が示されている。ADでは、早期から、後部帯状回の脳血流、糖代謝が低下することが報告されているが、MCIを対象とした検討でも、後部帯状回の脳血流および糖代謝の低下が示されている<sup>5)</sup>。これらの報告ではいずれも、その異常はAD患者に比較すると軽度であり、少なくともMCIの一部の例はADのprodromal stageであることを示唆している。

## 2) Vascular MCI

MCIをADに先行する病態であるにとらえる考えと同様に、MCI例の一部には、血管性痴呆(VD)の病前状態の例が含まれているとして、vascular MCIという概念が提唱されている。Meyerら<sup>6)</sup>は、291例の健常者の約4年のprospective study期間中にVDを発症した27例のうち、15例(55.6%)が前駆状態としてMCIを経ており、MCIを先行する症例の2/3は小血管病変による痴呆であったと報告している。一方、残りの12例はMCIを経ずにVDを発症し、これらの多くは多発皮質梗塞性痴呆および認知機能上重要な意義を有する部位の梗塞による痴呆であり、VD、特に小血管病変に伴うBinswanger型血管性痴呆や多発小梗塞性痴呆など、皮質下性のVDではMCIの状態が先行する例が多いことが示唆される。

Frisoniら<sup>7)</sup>は、vascular MCIの臨床的特徴を検討し、変性機序に基づくMCIに比べ、カードソーティングテストや語流暢性など前頭葉機能検査の成績の低下が目立ち、姿勢反射障害や歩行障害など、振戦を伴わないパーキンソニズムを合併する例が多かったと報告している。また、40カ月以上の経過観察後、vascular MCI患者の50%は死亡しており、生存者の68%が明らかな機能低下や認知障害を認めナーシングホームに入所していたが、変性機序に基づくMCIは全例が生存し、ナーシングホーム入所者は17%であったことから、vascular MCI患者は進行も早く、予後も不良な例が多いことから、特

徴的な臨床症状を基に早期に鑑別し、進行防止を考える必要性を強調している。

## 2. MCIの予後

### a. 高齢者の軽度の認知機能低下あるいは記憶障害に関する概念

高齢者の軽度の認知機能低下あるいは記憶障害を表現する幾つかの用語が用いられてきた。これらは概念的に痴呆とは異なる非進行性の記憶障害であるとする立場と、痴呆のprodromal stateであるとする立場に分かれる。Kralは高齢者にみられる健忘を、良性と悪性の2つに分け、病識があり、部分的な非進行性の記憶障害としてbenign senescent forgetfulness(良性健忘)の概念を提唱し、ADなどにみられる体験の全体を忘れる悪性健忘と区別した。1986年にNational Institute of Mental Healthは、age-associated memory impairment(AAMI)の概念を提唱した。AAMIは、記憶障害を有する高齢者を、非進行性の良性健忘に近い病態として、ADやVDなど特異的な疾患に基づく記憶障害および記憶障害を呈さない健常高齢者と区別する目的で提唱された。

Benign senescent forgetfulnessとAAMIはいずれも、‘他の認知機能障害を伴わない記憶障害’という状態像に加えて、‘認知機能障害は非進行性で痴呆に移行しない’という予後を含めた概念であった。

しかし、AAMIと診断された例を長期的に経過観察するとADに移行する例も少なくないことから、AAMIはheterogeneousな概念として考えられるようになり、良性健忘としてのAAMIの概念はあまり用いられなくなった。

一方、MCIの概念は、記憶に選択的な障害を有し、痴呆、特にADに高率に移行する病態としてスタートしている。

### b. MCIおよび類似の病態における痴呆への移行

MCIおよび痴呆を伴わない高齢者の軽症認知機能障害の予後に関して、これまで多くの検討がなされ、健常高齢者に比較して高率にADに移行することが報告されている(表1)。Pe

表1 MCIおよび類似概念における痴呆発症率

概念	診断基準	著者	観察期間 (年)	痴呆 発症率(%)	年間痴呆 発症率(%)
MCI 1995	記憶障害の訴え + 記憶障害 + 全般的な知能は保たれる	Petersen ら	1.5 3 4.5	24 44 55	16 14.7 12.2
memory impairment 1996	かかりつけ医の診察	Tierney ら	2	24	12
isolated memory loss 1997	記憶障害 + 他領域の認知障害なし	Bowen ら	4	48	12
MCI 1999	記憶障害の訴え + 記憶障害 + 全般的な知能は保たれる	Petersen ら	4	48	12
cognitive impairment no dementia 2001(40)	病歴, 診察, 心理テスト で認知機能障害あり	Unverzagt ら	1.5	26	17
MCI 2001	記憶障害の訴え + 記憶障害 + 全般的な知能は保たれる	Ritchie ら	3	11	4
age-associated cognitive decline 2001	記憶・学習, 注意・集中, 思考, 言語, 視空間認知 のいずれかで障害あり	Ritchie ら	3	29	10

tersenらは、前述の診断基準を満たすMCI患者66例を経過観察し、18カ月後には24%、36カ月後には44%、54カ月後には55%の例が痴呆を発症したと報告している<sup>9)</sup>。またTierneyら<sup>8)</sup>は、記憶障害でかかりつけ医を受診した痴呆のない患者123例を2年間経過観察し、29例(24%)が痴呆に至ったとしている。更にBowenら<sup>7)</sup>は、他領域の認知障害を伴わない記憶障害であるisolated memory lossの患者21人を平均2年間観察し、経過中10例(48%)が痴呆を発症したと報告している。

一方、Bozokiら<sup>10)</sup>は、記憶障害を有するが痴呆の診断基準を満たさない例を対象に言語、注意・集中力、視空間認知、語の流暢性を検討し、障害が記憶に限定している例と、他の領域に及ぶ例で、ADへの移行の頻度を検討した。2年間の経過観察では、障害が記憶に限定している例では6%がADに移行したが、他の領域に及ぶ例では48%がADに移行した。更にその後、平均4年間の経過観察では、障害が記憶に限定して

いる例では24%がADに移行し、他の領域に及ぶ例では77%がADに移行したと報告している。

更にRitchieら<sup>11)</sup>は、記憶に選択的な障害を有するMCIは有病率3.2%で、その症例が3年間で痴呆に至る率は11.1%であるのに対して、記憶・学習、注意・集中、思考、言語、視空間認知のいずれかの領域で軽度の障害を有するAACDでは有病率19.3%で、その症例が3年間で痴呆に至る率は28.6%で、痴呆の予測因子としてはMCIよりもAACDが優れていると報告している。

### c. 痴呆発症の predictive factor

Petersenらも、MCIをamnesic MCI, multiple-domain MCI, non-memory-domain MCIの3つのsubtypeに分けることを提唱しており、MCIを痴呆の前駆症状あるいはpreclinical stageとして、予後判定や痴呆への移行の予防を目的とした治療を考えると、どのような特徴を有するMCIが痴呆への移行率が高いのか、それぞれのタイプのMCIの基礎にある病理は

何か、更に各タイプのMCIが進行した場合、どの痴呆を発症するのかを明らかにしていく必要がある。

ApoEは299個のアミノ酸からなる分子量約35,000の蛋白質であり、コレステロールを主とする脂質の運搬、代謝に関与している。ApoE遺伝子は、第19染色体長腕に位置し、3つの主要な対立遺伝子型 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ がある。1993年、Strittmatterらは家族性遅発性AD患者において、 $\epsilon 4$ の遺伝子頻度が対照の3倍以上高いことを報告した。その後、孤発性の遅発性ADでも $\epsilon 4$ が高頻度に認められることが報告され、更にAD患者で $\epsilon 4$ の遺伝子数が0個から1個、2個と増えるに従い、発症年齢が若年化するというgene dose effectが明らかになった。ApoE $\epsilon 4$ がADの発症を促進する機序に関しては、 $A\beta$ の凝集・沈着に直接関与しているとする可能性と脂質代謝を介して $A\beta$ 代謝に何らかの影響を及ぼすという2つの可能性が考えられている。更に $\epsilon 4$ はVDのリスクでもあることが報告されている。PetersenらはMCI患者をprospectiveに経過観察し、ApoE $\epsilon 4$ を有する例は、有さない例に比して、相対危険度4.36でMCIから痴呆発症の最大のリスクであったと報告している<sup>1)</sup>。Tierneyら<sup>8)</sup>もADのpredictive factorとしてApoE $\epsilon 4$ の有用性を評価している。

一方、Arnaizら<sup>13)</sup>は、MCIを3年にわたる経過中ADを発症したprogressive MCIとADを発症しなかったstable MCIを比較して、発症予測には、側頭-頭頂葉のグルコース代謝とブロック組みなどの視空間認知機能の組み合わせが有用であったと報告している。また、Okamuraら<sup>9)</sup>は、後部帯状回の血流低下と髄液中タウ濃度の組み合わせでsensitivity 88.5%、specificity 90%でMCIにおける痴呆の発症を予測できたとしている。MRIによる検討では海馬の萎縮や嗅内皮質、上側頭回および前部帯状回の萎縮がADの発症の予測に有用であったと報告されている<sup>13)</sup>(表2)。

### 3. MCIの治療の試み

少なくともMCIの一部の例はADの prodromal stage

表2 MCIから痴呆への進行を予測する因子

ApoE $\epsilon 4$ (Petersenら、Tierneyら)
MRIにおける海馬の萎縮(Jackら)
MRIにおける嗅内皮質、上側頭回および前部帯状回の萎縮(Killianyら)
側頭-頭頂葉のグルコース代謝と視空間認知機能との組み合わせ(Arnaizら)
後部帯状回の血流低下と髄液中タウ濃度の組み合わせ(Okamuraら)

mal stageにあり、病理学的にはADと共通の病態を有することを考えると、MCIを対象にADに対する治療を行うことにより、MCIから痴呆、特にADへの移行を抑制し、遅らせる効果が期待される。ADのprodromal stageに相当する例を正しく診断することが可能になれば、将来的には $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬や $A\beta$ ワクチンなどアミロイドカスケードを考慮した治療が実現するかもしれない。

コリンエステラーゼ阻害薬は、アセチルコリンエステラーゼを阻害して、シナプス間隙での分解を遅らせ、アセチルコリン系を賦活することにより、ADの認知機能障害を改善する。MCIにおいても、前脳基底核におけるコリン作動性ニューロンの減少が報告されており、コリンエステラーゼ阻害剤の適応と考えられる<sup>14)</sup>。しかし、ADのpreclinical stageではコリン系はupregulationにより代償されているとして、MCIに対するコリンエステラーゼ阻害剤の使用に否定的な意見もある<sup>15)</sup>。ドネベジル、ガラントミン、リバスチグミンなどのコリンエステラーゼ阻害剤の臨床経験が始まっているが、まだ結果は出ていない。

老化に関する酸化ストレスの関与から、抗酸化作用をもつ薬剤がADの進行を遅らせる可能性が考えられてきた<sup>16)</sup>。MCIにおける酸化ストレスの関与を示唆する報告もあり、抗酸化薬も試みられている。

まだコンセンサスは得られていないが、ADの非薬物療法の効果は軽症例ほど有効であること、MCIの適応をもつ薬剤はないことを考えると、MCIへの非薬物療法は積極的に取り組むべき課題である。日常生活動作に支障のないMCI

は介護保険の適応とはならず、非薬物療法を地域に密着した活動に求める取り組みなどが注目されている。

## ■ 文 献

- 1) Petersen RC, et al: Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA* 273: 1274-1278, 1995.
- 2) Levy R: Aging-associated cognitive decline. *Int Psychogeriatr* 6: 63-68, 1994.
- 3) Petersen RC (ed): Conceptual overview. In: *Mild Cognitive Impairment*, p1-14, Oxford University Press, New York, 2003.
- 4) Buerger K, et al: CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology* 59: 627-629, 2002.
- 5) Okamura N, et al: Combined analysis of CSF Tau levels and [(123)I]iodoamphetamine SPECT in mild cognitive impairment: Implications for a novel predictor of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 159: 474-476, 2002.
- 6) Meyer JS, et al: Is mild cognitive impairment prodromal for vascular dementia like Alzheimer's disease? *Stroke* 33: 1981-1985, 2002.
- 7) Frisoni GB, et al: Mild cognitive impairment with subcortical vascular features: clinical characteristics and outcome. *J Neurol* 249: 1423-1432, 2002.
- 8) Tierney MC, et al: The prediction of Alzheimer disease. The role of patient and informant perceptions of cognitive deficits. *Arch Neurol* 53: 423-427, 1996.
- 9) Bowen J, et al: Progression to dementia in patients with isolated memory loss. *Lancet* 349: 763-765, 1997.
- 10) Bozoki A, et al: Mild cognitive impairments predict dementia in nondemented elderly patients with memory loss. *Arch Neurol* 58: 411-416, 2001.
- 11) Ritchie K, et al: Classification criteria for mild cognitive impairment: a population-based validation study. *Neurology* 56: 37-42, 2001.
- 12) Arnaiz E, et al: Impaired cerebral glucose metabolism and cognitive functioning predict deterioration in mild cognitive impairment. *Neuroreport* 12: 851-855, 2001.
- 13) Jack C, et al: Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology* 52: 1397-1403, 1999.
- 14) Mufson EJ, et al: Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 443: 136-153, 2002.
- 15) DeKosky ST, et al: Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51: 145-155, 2002.
- 16) Sano M, et al: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336: 1216-1222, 1997.

# 無症候性脳梗塞

岩手医科大学名誉教授・相武病院顧問・新東京病院顧問 東儀英夫

Key Word ○無症候性脳梗塞 ○危険因子 ○認知機能 ○vascular dementia  
○vascular depression

無症候性脳梗塞とは、神経症状を呈さず、一過性脳虚血発作を含む脳虚血発作の既往がない例に画像診断で見出される脳梗塞病変と定義される<sup>1-3)</sup>。画像診断上の指針はすでに詳細に記載されている<sup>3)</sup>。無症候性脳梗塞は剖検脳でも見出される。画像診断上、見出された場合の臨床的意義は、①それが脳虚血発作の危険性を予知するか、もしそうであれば虚血性発作あるいは梗塞巣の数の増加に対していかなる予防対策を講ずべきか、②高次脳機能にいかなる影響を与えるか、にある。以下、これらの点を中心に述べる。

## I. 頻度、病型、血管病変

CTあるいはMRIで見出される無症候性脳梗塞は、①脳卒中発作の際に見出される症候に無関係の陳旧性の脳梗塞（診断基準では“無症候性脳血管病巣”として区別される）、②頭痛、めまいなどの不定愁訴があって、これとは関係がないと思われる部位に見出される陳旧性の脳梗塞、③神経症状はなく、脳ドックで見出された脳梗塞、に分けられる。このうち、主たる関心が向けられているのは脳ドックで見出される無症候性脳梗塞である。

無症候性脳梗塞の頻度は、患者の受診背景のほか、年齢、画像診断機器（CT、MRI）などによって異なるが、加齢、危険因子の数とともに著しく増加する<sup>4)</sup>。CT上、初発脳血管障害例の約10%に無症候性脳梗塞が認められる。

無症候性脳梗塞においても症候性脳梗塞と同様にラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、塞栓症などの病型がある。日本では、無症候性脳梗塞の大部分はラクナ梗塞である。その分布は症候性脳梗塞と同じく、大脳基底核、皮質および皮質下白質、橋底部、視床、小脳の順に多く、このうち大脳基底核、視床、橋底部などのラクナは血管壊孔の好発部位に一致する<sup>5)</sup>。

大脳白質深部にみられる斑状または融合性の高信号変化（leukoaraiosis, Hachinski, 1987）<sup>6)</sup>は必ずしも虚血のみと関係があるとはいえないが、高血圧などの危険因子を有する例が多く、血管性に出現する例が多いと考えられる。

無症候性脳梗塞、白質病変のいずれも脳内細小動脈（髄質動脈、穿通枝動脈）の病変によって生ずる場合が多いが、脳内・外主幹動脈のアテローム硬化を伴うこともある。脳血管性障害の病型が西歐化しつつあり、ラクナ梗塞、白質病変におい



でもMRAあるいは超音波検査による血管のチェックが望まれる。

## II. 脳卒中の危険因子としての 無症候性脳梗塞の意義

高血圧、糖尿病、喫煙、心房細動など、症候性脳梗塞の危険因子は無症候性脳梗塞の危険因子でもある<sup>7-11)</sup>。とくに高血圧が重要であり、夜間の生理的降圧が認められない例 (non-dipper)、逆に夜間の降圧が著しい例 (extreme dipper) に注意を要する<sup>12-13)</sup>。無症候性脳梗塞群の危険因子の程度および頻度は、非梗塞群よりも高く、脳梗塞発症例より低く、その中間に位置する。

それでは無症候性脳梗塞は脳梗塞発作の危険因子の存在を単に反映するに過ぎないのであろうか。この疑問に答えるためには、無症候性脳梗塞を有する例が、有しない例に比して脳卒中発症のリスクが高いか否かを明らかにする必要がある。鈴木は高血圧例を対象に、CT画像に基づいて検討し、無症候性脳梗塞がない群の脳卒中発症率0.85%/年に比して、ある群では1.87%/年で有意に高いと報告している。後者の値は高血圧のある脳梗塞症例の脳卒中再発率1.89%/年に匹敵する。年齢で補正すると、この値は2.62%/年に増加し、高血圧のある脳梗塞症例の年齢補正した脳卒中再発率2.65 (%/年) に近い<sup>8)</sup>。

同様にCTを用いた延原の研究では、脳卒中発症率は無症候性脳梗塞例で危険因子がない群2.0%/年、危険因子がある例では2.78%/年である。後者の値は脳梗塞症例の脳卒中再発率2.53%/年よりもむしろ高い<sup>9)</sup>。

MRIを用いたKobayashiの研究では、脳卒中発症率は無症候性脳梗塞がない群の0.21%/年に比し、ある群では2.79%/年と10倍以上である<sup>10)</sup>。

以上の結果は、無症候性脳梗塞は脳卒中の危険因子を反映するにとどまらず、それ以上のリスク

を予知することを示している。高血圧などの危険因子を有しているにもかかわらず脳卒中発作を呈さず、天寿を全うする例は少なくない。この事実は脳梗塞発作の出現には危険因子のうえにさらに何らかの未知の要因が関与していることを示唆している。無症候性脳梗塞は、そのような要因を有していることを示唆している可能性がある。

## III. 症候性脳梗塞発作の予防対策

高血圧、糖尿病、高脂血症などを有する例では、その積極的治療が重要である。

症候性脳梗塞発作後の再発予防における抗血小板薬の効果に関しては、欧米の臨床試験では対象例にアテローム血栓性脳梗塞とラクナ梗塞の両者を含んでおり、病型別のサブグループの解析は行われていない。脳梗塞全体に対して有効であるならば、ラクナ梗塞に対しても有効であろうと考えているようである。日本の臨床試験では症候性ラクナ梗塞に対する抗血小板療法は、再発予防効果が認められず、脳出血を起こす可能性もあり、勧められていない<sup>14)</sup>。脳卒中発症例の約20%は脳出血であり、高血圧のコントロールがきわめて重要である。最近、MRI T2\*により陳旧性微小出血が意外に多いことが広く知られるようになった。これが将来の脳出血発作を予知する所見であるか否かが注目される。心房細動を有する例で、無症候性脳梗塞が皮質にあり、脳塞栓症が疑われる場合には、ワーファリンなどの抗凝結療法を考慮する。

## IV. 無症候性脳梗塞、白質病変における 高次脳機能障害

### ①軽度の認知機能障害

無症候性脳梗塞は、神経学的には無症候であるが、軽度の認知機能の低下、抑うつ状態と関係があるというデータが蓄積されてきた。無症候性脳梗塞は、痴呆のない高齢者にも高頻度に

認められるが、詳しく検討すると、認知機能の低下が認められ<sup>15, 16)</sup>、とくに注意・集中力や遂行機能など、前頭葉に関連した認知機能が障害されている<sup>17, 18)</sup>。

白質病変の出現頻度と神経心理学的検査成績の低下はともに加齢と相関する。年齢で補正すると、白質病変と神経心理学的検査成績には関連を認めないという報告もあるが、注意・集中力や情報処理、遂行機能など、前頭葉に関連した認知機能の低下を示唆する報告が多い。

#### ②痴呆の危険因子としての無症候性脳梗塞

無症候性脳梗塞は、血管性痴呆の危険因子でもある。痴呆のない65歳以上の久山町住民828名を7年間追跡した結果によると、50例に痴呆が出現している。脳病変を検索しえた43例の内訳をみると、多発性小梗塞または多発性小・中梗塞を有した例は31例(72%)、Binswanger病は2例(5%)である<sup>7)</sup>。43例のうち33例(79%)は脳卒中発作の既往を有している。

脳卒中発作の既往がある例では血管性痴呆のみならず、アルツハイマー病のリスクが高い<sup>19)</sup>。剖検でラクナ梗塞が見出された例では対照例に比べて、生前、痴呆を呈していた例が多く、アルツハイマー病の病理所見が軽度でも痴呆を呈しうる<sup>20, 21)</sup>。臨床病理学的検討によると、梗塞巣を有するアルツハイマー病患者の脳では梗塞巣を有しない患者の脳に比べて老人班、神経原線維変化の程度が同じか、軽度である<sup>22)</sup>。アルツハイマー病患者では、痴呆を呈しない対照例に比べてMRI上無症候性脳梗塞がより高頻度に見出される<sup>23)</sup>。無症候性脳梗塞が見出された例では、その後、認知機能が低下する頻度が高く、痴呆になるリスクが約2倍になると報告されている<sup>24)</sup>。この認知機能の低下は再検査で梗塞巣の数の増加を示す例に限られており、階段状に認知機能が低下するものと推定される。記憶障害は無症候性の

視床梗塞と関連し、視床以外の部位の梗塞は精神運動の遅延と関連がある<sup>24)</sup>。

#### ③抑うつ状態

老年者における脳動脈硬化に伴う抑うつ状態は、古くから記載がある。画像診断の進歩とともに、脳血管障害とうつ病の因果関係が再び取り上げられるようになり、Alexopoulos, KrishnanらによりDiagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (DSM-IV)における血管性痴呆(vascular dementia)に準じて血管性抑うつ状態(vascular depression)の概念が提唱された<sup>25)</sup>。脳卒中後にうつ病が生じた場合は、post-stroke depression<sup>26)</sup>、神経学的に脳梗塞の徴候がないが、MRIで脳梗塞が認められる場合には、MRI-defined vascular depressionと呼ばれている<sup>27)</sup>。

Alexopoulos (1997)によって記載されたvascular depressionの臨床像では、うつ病の症状以外に認知機能障害が含まれている。血管性うつ病は病識、罪業感に乏しく、気分障害の家族歴がなく、意欲低下、無気力、精神運動制止が強いことが特徴である<sup>28)</sup>。小林らは“やる気スコア”を作成し、やる気スコア低下例は無症候性脳梗塞のある例(37.8%)では、ない例(24.5%)よりも頻度が高く、脳室周囲の高信号(PVH)が3度の例ではやる気低下が71.4%と高率であったと報告している<sup>29)</sup>。

#### ④脳血流および脳代謝

ラクナ多発例、白質病変例に関するPETを用いた研究では脳血流量が低下し、酸素代謝が正常に保たれ、酸素摂取率が上昇しmisery perfusionの状態にある<sup>30)</sup>。部位別にみると、とくに前頭葉の機能低下を示す。これは神経心理学的検査の所見、vascular depressionの症状的特徴と一致するとともに、皮質下性痴呆である血管性痴呆の画像所見とも合致する。

## おわりに — 今後の課題 .....

無症候性脳梗塞の臨床的意義について、脳卒中の危険因子としての側面と、認知機能障害の原因としての側面から述べた。

高血圧などの危険因子を有している例のなかにも、無症候性脳梗塞を有する例はさらに高い脳卒中発作のリスクがあることは確かである。この事実は脳虚血発作の警告症状である一過性虚血発作と類似の意義がある。したがって、抗血栓薬を投与した場合の脳梗塞発作に対する予防効果について、レベルの高いエビデンスの構築が重要な課題である。

無症候性脳梗塞が認知機能障害 (vascular cognitive impairment) あるいは抑うつ状態を伴

っている場合、その治療、進行予防に関するデータの蓄積が必要である。

認知機能低下に関しては、アルツハイマー病も今まで以上に考慮する必要がある。アルツハイマー病の発症促進因子としての無症候性脳梗塞の意義、逆に、血管性痴呆の背景にある subclinical なアルツハイマー病の病変などの観点からの検討を要する。現在、ベンゾオキサゾール誘導体など脳アミロイドの画像化の研究が進展しており、近い将来に実用化されれば、これらの問題を臨床的に解明する有力な手段となりうる。

## 文献

- 1) 平井俊策：脳の動脈硬化性疾患の定義および診断基準に関する研究。平成元年度厚生省循環器病研究報告、国立循環器病センター、1990、p80.
- 2) 澤田 徹：無症候性脳血管障害は本当に無症候か。臨床成人病 24：147-152、1994.
- 3) 脳ドック学会の新ガイドライン作成委員会：脳ドックのガイドライン。日本脳ドック学会、2003.
- 4) Shinkawa A, Ueda K, Kiyohara Y, et al: Silent cerebral infarction in a community-based autopsy series in Japan: the Hisayama study. Stroke 26: 380-385, 1995.
- 5) 宇高不可思：無症候性脳梗塞の画像と病理 無症候性脳梗塞の脳内分布—MRIと病理の対比、Clinical Neuroscience 17: 173-176, 1999.
- 6) Hachinski VC, Potter P, Merskey H: Leuko-araiosis. Arch Neurol, 44: 21-23, 1987.
- 7) 清原 裕：無症候性脳梗塞の疫学 久山町の最近の実態。Clinical Neuroscience 17: 157-159, 1999.
- 8) 鈴木一夫：無症候性脳梗塞の危険因子と脳卒中危険因子としての無症候性脳梗塞の検討。総合臨床、43: 2744-2748, 1994.
- 9) 延原幸嗣, 西丸雄也：無症候性脳梗塞患者の長期予後。脳卒中 18: 302-309, 1996.
- 10) Kobayashi S, Okada K, Koide H, et al: Subcortical silent brain infarction as a risk factor for clinical stroke. Stroke 28: 1932-1939, 1997.
- 11) Kempster PA, Gerraty RP, Gates PC: Asymptomatic cerebral infarction in patients with chronic arterial fibrillation. Stroke 19: 955-957, 1988.
- 12) Tohgi H, Chiba K, Kimura M: Twenty-four hour variation of blood pressure in vascular dementia of the Binswanger type. Stroke 22: 603-608, 1991.
- 13) Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, et al: Nocturnal fall of blood pressure and silent cerebrovascular damage in elderly hypertensive patients. Advanced silent cerebrovascular damage in extreme dippers. Hypertension 27: 130-135, 1996.
- 14) Yamaguchi T, Nishimaru K, Minematsu K, et al: Benefits and hazards of antiplatelet therapy in ischemic cerebrovascular diseases. 脈管学 34: 279-285, 1994.
- 15) Longstreth WT Jr, Bernick C, Manolio TA, et al: Lacunar infarcts defined by magnetic resonance imaging of 3660 elderly people: the Cardiovascular Health Study. Arch Neurol 55: 1217-1225, 1998.
- 16) Vermeer SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, et al: Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. Stroke 33: 21-25, 2002.
- 17) Fushimi H, Inoue T, Yamada Y, et al: Asymptomatic lacunes and their relationship to intellectual disturbances. Internal Medicine 33: 317-320, 1994.
- 18) 高橋 智, 岡本牧子, 東儀英夫: 高齢者における脳梗塞後遺症と痴呆症の診断と薬物療法 treatable dementiaを見逃すな! 脳梗塞後遺症の診断と鑑別診断 脳血管性痴呆と脳血管性うつ状態を中心に。Mebio 18: 81-86, 2001.

- 19) Henon H, Durieu I, Guerouaou D, et al : Poststroke dementia : incidence and relationship to prestroke cognitive decline. *Neurology* 57 : 1216-1222, 2001.
- 20) Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, et al : Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer's disease : the Num study. *JAMA* 277 : 813-817, 1997.
- 21) Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS) . Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* 357 : 169-175, 2001.
- 22) Berg L, McKeel DW Jr., Miller JP, et al : Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease : relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 55 : 326-335, 1998.
- 23) Barber R, Scheltens P, Gholkar A, et al : White matter lesions on magnetic resonance imaging in dementia with Lewy bodies, Alzheimer's disease, vascular dementia, and normal aging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67 : 66-72, 1999.
- 24) Vermeer SE, Prins ND, Heijer TD, et al : Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*, 348 : 1215-1222, 2003.
- 25) Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, et al : Clinically defined vascular depression. *Am J Psychiatry* 154 : 562-565, 1997.
- 26) Robinson RG, Kubos KL, Starr LB, et al : Mood disorders in stroke patients ; Importance of location of lesion. *Brain* 107 : 81-93, 1984.
- 27) Krishnan KRR, Hays JC, Blazer DG : MRI-defined vascular depression. *Am J Psychiatry* 154 : 497-501, 1997.
- 28) 中川賢嗣, 田辺敬貴 : 気分障害 ; 最新の知見—脳血管障害とうつ病. *臨床精神医学* 29 : 1009-1014, 2000.
- 29) 岡田和悟, 小林祥泰, 青木 耕, 須山信夫ほか : やる気スコアを用いた脳卒中後の意欲低下の評価. *脳卒中* 20 : 318-323, 1998.
- 30) Hatazawa J, Shimosegawa E, Satoh T, et al : Subcortical hypoperfusion associated with asymptomatic white matter lesions on magnetic resonance imaging. *Stroke* 28 : 1944-1947, 1997.

## Munc13-4 Is a GTP-Rab27-binding Protein Regulating Dense Core Granule Secretion in Platelets\*

Received for publication, August 25, 2003, and in revised form, December 16, 2003  
Published, JBC Papers in Press, December 29, 2003, DOI 10.1074/jbc.M309426200

Ryutaro Shirakawa†, Tomohito Higashi‡, Arata Tabuchi‡, Akira Yoshioka†\*\*,  
Hiroaki Nishioka‡††, Mitsunori Fukuda§, Toru Kita¶, and Hisanori Horiuchi‡‡

From the Departments of †Geriatric Medicine and ‡Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan and the §Fukuda Initiative Research Unit, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198 Japan

Platelets store self-agonists such as ADP and serotonin in dense core granules. Although exocytosis of these granules is crucial for hemostasis and thrombosis, the underlying mechanism is not fully understood. Here, we show that incubation of permeabilized platelets with unprenylated active mutant Rab27A-Q78L, wild type Rab27A, and Rab27B inhibited the secretion, whereas inactive mutant Rab27A-T23N and other GTPases had no effects. Furthermore, we affinity-purified a GTP-Rab27A-binding protein in platelets and identified it as Munc13-4, a homologue of Munc13-1 known as a priming factor for neurotransmitter release. Recombinant Munc13-4 directly bound to GTP-Rab27A and -Rab27B *in vitro*, but not other GTPases, and enhanced secretion in an *in vitro* assay. The inhibition of secretion by unprenylated Rab27A was rescued by the addition of Munc13-4, suggesting that Munc13-4 mediates the function of GTP-Rab27. Thus, Rab27 regulates the dense core granule secretion in platelets by employing its binding protein, Munc13-4.

Upon stimulation, platelets secrete self-agonists, such as ADP and serotonin, which are stored in dense core granules (1). These secreted agonists contribute to the explosive activation of platelets in the processes of hemostasis and thrombus formation by a positive feedback mechanism (1). Despite this biological significance (1), the molecular mechanisms underlying this regulated exocytosis remain largely unclear.

Rab GTPases are essential regulatory molecules in vesicle transport (2, 3) and to date more than 50 members have been identified in mammals. Rab GTPases are localized to specific organelles and regulate several steps of vesicle transport including vesicle movement along cytoskeletal tracks and vesicle tethering to the target membrane by employing effector molecules that interact with GTP-bound Rab proteins (2, 3).

\* This work was supported by Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology Research Grants 11680629 and 15081101 (to H. H.) and 12CE2006, 09281104, and 13307034 (to T. K.), by Health and Labour Sciences Research Grant H14-Tyouju-012 from the Ministry of Health Labour and Welfare (to T. K. and H. H.), and in part by grants from the Takeda Science Foundation, Suzuken Memorial Foundation, the Study Group of Molecular Cardiology, and the Novartis Foundation for Gerontological Research (to H. H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-75-751-3464; Fax: 81-75-751-3574; E-mail: horiuchi@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

\*\* Present address: Department of Internal Medicine, Mitsubishi Kyoto Hospital, Kyoto, 615-8087 Japan.

†† Present address: Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, South Parks Rd., Oxford OX1 3RE, United Kingdom.

Recently, the *ashen* phenotype in mice has been demonstrated to be caused by a mutation in Rab27A (4). *Ashen* mice exhibit impaired coat color because of defective melanosome distribution, where Rab27A links a motor protein myosin Va and actin to melanosomes through its effector, melanophilin/Slac2-a (5–10). In addition, in cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in *ashen* mice, lytic granule secretion is impaired presumably at the docking/fusion step (11, 12). Interestingly, it has been demonstrated that the bleeding time of *ashen* mice is prolonged because of platelet dysfunction caused by a lack of intact platelet dense core granules (4, 13). However, it is important to note that platelets also contain Rab27B, a homologue of Rab27A with 71% identity in the amino acid level, which may compensate for the defect of Rab27A in platelets in *ashen* mice (14). These studies emphasize the requirement of further investigation into the mechanisms by which Rab27 may control the biogenesis and exocytosis of dense core granules in platelets.

The final step of vesicle transport is docking and fusion with the target membrane, which is mediated by *trans*-SNARE<sup>1</sup> complex between the vesicle SNARE and the target membrane SNARE (15). Accumulating evidence has revealed that Rab GTPases function upstream of SNARE pairing (2, 3). In addition to Rab GTPases, SNARE complex formation is directly regulated by several factors such as Munc18 and Munc13-1. In neuronal cells, Munc18 is thought to bind to the closed conformation of syntaxin1, a target membrane SNARE, to inhibit the *trans*-SNARE complex formation (16, 17). In contrast, Munc13-1 acts as a priming factor in neuronal secretion (18). Munc13-1 is suggested to promote formation of an open conformation of syntaxin1 and induce the assembly of *trans*-SNARE complexes. This is supported by the fact that transmission defects of *unc-13* mutants in *Caenorhabditis elegans* could be rescued by expression of open form of syntaxin (19). Munc13-1 and its homologues, Munc13-2 and Munc13-3, are expressed exclusively in brain, except for ubMunc13-2, a splicing variant of Munc13-2 (20, 21). In brain, each Munc13 isoform expression pattern is spatially restricted, although there is some overlap between isoforms. Munc13-1-deficient mice exhibit partial defects in glutamatergic neuron neurotransmitter release (22), whereas Munc13-1/Munc13-2 double knockout mice have complete loss of synaptic transmission in not only glutamatergic neurons but also GABAergic neurons (23). These studies in mice have revealed the essential and general roles of Munc13s in neurotransmitter release. Recently, the fourth Munc13 ho-

<sup>1</sup> The abbreviations used are: SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; PKC, protein kinase C; SLO, streptolysin-O; GST, glutathione S-transferase; GTPγS, guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate; TOF-MS, time-of-flight mass spectrometry.

mologue, Munc13-4, was identified (24). In contrast to Munc13-1-3, Munc13-4 is expressed in non-neuronal tissues (24), and its biological function remains to be elucidated.

Here, we demonstrate that Rab27 regulates the  $Ca^{2+}$ -induced dense core granule secretion in platelets by showing that the addition of unprenylated Rab27 in an *in vitro* assay with permeabilized platelets inhibited the secretion. Furthermore, we identified a novel GTP-Rab27-binding protein in platelets as Munc13-4 and demonstrate that Munc13-4 mediates the function of GTP-Rab27 to promote the secretion.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

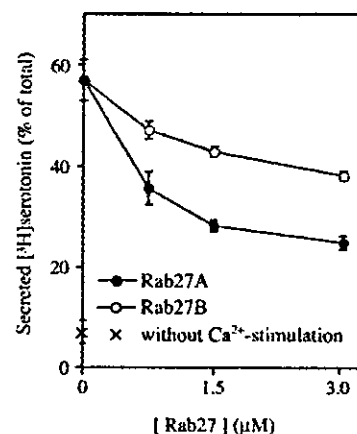
**Antibodies, Constructs, Materials, and Others**—Anti-Na,K-ATPase rabbit polyclonal antibody (25) was a kind gift from Dr. K. Omori (Kansai Medical University, Kadoma, Japan). Anti-His<sub>6</sub> and anti-PKC $\alpha$  monoclonal antibodies were purchased from Qiagen and Santa Cruz Biotechnology, respectively. Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse and anti-rabbit IgG polyclonal antibodies were from Amersham Biosciences and were used as secondary antibodies for Western blot analysis visualized by enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences). Unless otherwise specified, all of the other chemicals were purchased from Sigma, except for SLO, which was from Dr. S. Bhakdi (Mainz University, Mainz, Germany) (26).

The protein concentrations were determined by the Bradford method (Bio-Rad) or from the intensities of the bands in Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gels using bovine serum albumin as a standard. cDNA encoding Rab27A was kindly provided by Dr. Y. Nozawa (Gifu International Institute of Biotechnology, Gifu, Japan) (27), and mutants Rab27A-Q78L and Rab27A-T23N were generated by PCR mutagenesis. cDNAs encoding Rap1B (28) and Rab3B (29) were from Dr. Y. Takai (Osaka University, Osaka, Japan), and Rab4B (30) and Rab5A (30) were from Dr. M. Zerial (Max Plank Institute, Dresden, Germany). Human Rab27B cDNA was isolated from the Marathon-Ready human bone marrow cDNA (Clontech) by PCR. All of these cDNAs were subcloned into the prokaryotic expression vector pDEST17 (Invitrogen) for His<sub>6</sub>-tagged recombinant protein production. GST fusion proteins of Rab3B, Rab4B, Rab5A, Rab27A, and Rab27B were produced by subcloning the cDNAs into pGEX-2T (Amersham Biosciences). These His<sub>6</sub>-tagged and GST fusion proteins were produced in *Escherichia coli* strain BL21 and purified on nickel-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen) and glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences), respectively. For full-length Munc13-4 recombinant protein production, the cDNA of Munc13-4 was subcloned into pDEST10 (Invitrogen), and a baculovirus encoding the full-length Munc13-4 was produced using the Bac-to-Bac system (Invitrogen). His<sub>6</sub>-tagged Munc13-4 recombinant protein was produced in Sf9 insect cells upon infection with the virus and purified on nickel-nitrilotriacetic acid-agarose, followed by further purification with MonoQ anion exchange chromatography (Amersham Biosciences). All of the purified recombinant proteins were extensively dialyzed against buffer A (50 mM HEPES/KOH, pH 7.2, 78 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol) and stored at  $-80^{\circ}C$  until use. All of the sequences of the PCR products were confirmed by sequencing using a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

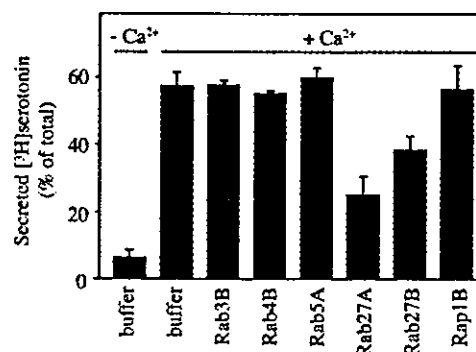
**The Assay for Secretion of Dense Core Granules**—The standard assay method for the  $Ca^{2+}$ -induced dense core granule secretion was essentially as described previously (31) except that human platelet cytosol was used (32) instead of rat brain cytosol. Unless otherwise specified, the standard assay was following: Freshly obtained washed platelets ( $1 \times 10^8$  platelets/assay, counted with the Coulter Counter) were incubated with [<sup>3</sup>H]serotonin ( $\sim 20,000$  cpm/assay) (Amersham Biosciences) to allow uptake into dense core granules. After washing the platelets, the platelet plasma membrane was permeabilized with SLO in Buffer A, where the calculated free calcium ion concentration was  $\sim 20$  nM (33). The permeabilized platelets were incubated with an ATP regeneration system, human platelet cytosol at 1.5 mg of proteins/ml (for Fig. 1) or 0.8 mg of proteins/ml (for Fig. 6), and tested materials at  $4^{\circ}C$  for 30 min followed by further incubation at  $30^{\circ}C$  for 2 min. Finally, the platelets were stimulated with  $20 \mu M$   $Ca^{2+}$  (33) at  $30^{\circ}C$  for 1 min, and the reaction was stopped by the addition of ice-cold Buffer A containing 10 mM EGTA. After removing platelets by centrifugation, [<sup>3</sup>H]serotonin released in the supernatant was measured by a liquid scintillation counter (Beckman). The secretion levels of [<sup>3</sup>H]serotonin were expressed as percentages of the total [<sup>3</sup>H]serotonin in the permeabilized platelets before the final incubation.

**GST-Rab27A Affinity Column Chromatography**—Human platelet pellets were provided by Kyoto Red Cross Blood Center and resus-

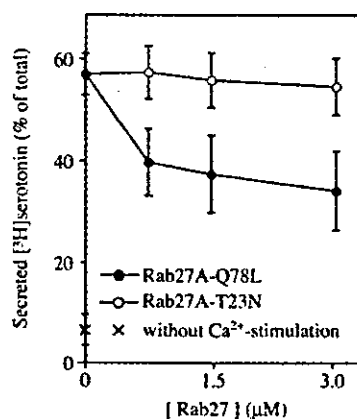
A.



B.



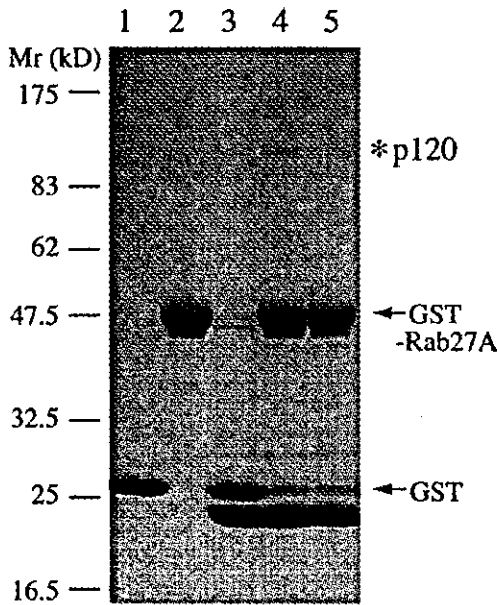
C.



**Fig. 1. Unprenylated Rab27 inhibits  $Ca^{2+}$ -induced dense core granule secretion.** Permeabilized platelets were first incubated at  $4^{\circ}C$  for 30 min with unprenylated His<sub>6</sub>-Rab27A (closed circles) and His<sub>6</sub>-Rab27B (open circles) purified from *E. coli* at various concentrations (A), with unprenylated His<sub>6</sub>-Rab3B, -Rab4B, -Rab5A, -Rab27A, and -Rab27B and Rap1B at  $3 \mu M$  (B), and with various concentrations of unprenylated mutant Rab27A-Q78L (closed circles) and Rab27A-T23N (open circles) (C). Then the  $Ca^{2+}$ -induced secretion of dense core granules was analyzed by measuring secreted [<sup>3</sup>H]serotonin preloaded in dense core granules as described under "Experimental Procedures." The secretion without  $Ca^{2+}$  stimulation is also shown in A and C (x). The results shown are expressed as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

ended in Buffer A. After disruption of the platelets by sonication, the sample was centrifuged at  $100,000 \times g$  at  $4^{\circ}C$  for 1 h. The supernatant was dialyzed against Buffer A and stored as human platelet cytosol at  $-80^{\circ}C$  until use. For the affinity chromatography, GTP $\gamma$ S- or GDP-bound GST-Rab27A was prepared by incubation of  $30 \mu g$  of GST-Rab27A with 1 mM GTP $\gamma$ S or GDP in Buffer A containing 10 mM EDTA at  $30^{\circ}C$  for 30 min, and the reaction was stopped by the addition of 15 mM MgCl<sub>2</sub> (34). Then the GST- or GST-Rab27A-coated beads were

A.

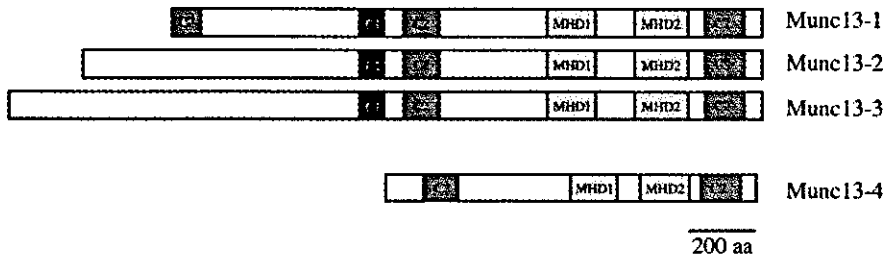


B.

```

1  MATLLSHPQQRPPFLRQAIKIRRRRVRDLQDPPQMAFHIQPPSHHFSPE
  QRALLYEDALYTVLHRLGHPENHYTEAGELRLRYLOEAFHYVEPEEHQQTLL
101 QRVRELEKPIFCILKATVKQAAGLILGKDVSGFSDPYCLLGIHQGVGVPGGS
  PGRHRKQKAVVRRHTIPSEETHRTQVITQTLNVPVWDETFILEFPEDITNASF
201 HLDMDLDTVESVRQKLGELTDLHGLRRIFKEARKDKGDDDFLGNVLRRL
  QDLRCREDQWYPLEPRTETYPDRGQCHLQFQLIHKRATASRSQPSYTV
301 HLHLLQQLVSEVTVQREAGSTSWDGSLSPOAATVLFHATQKDLSDPHQS
  MAQWLAYERLYQSLEFPSSCLLHPITSTIEYQWIQGRKAEQQEELAASFS
401 SLLTYGLSLIRFRFSVFPPLSVSDSPARLQSLRLLRVQNCMKAFGELCPN
  TAPLPQLVTEALQTGTTEWFHLKQHQHQPVMVQGIPEAGKALLGLVQDVIG
501 DLHQQRTWQKIFHNTLKIHLFSMAFREQLQWLVAKRQVDHTTVVGDVSP
  EMGESLFQLYISLKELCQLRMSSESDGVLALDNFRNFQPAIPSWLQKT
601 YNEALARVQRAVQMDLVLPLGELTEHSTSAVDLSTCFQAIQSHARQLDWP
  DPBEAFNITVKFVEDTCRLALVYCSLIKARARELSSGQEDQQQAANMLCV
701 VVNDMEQLRLVIGKLPALQAWAEALQRFVGVLEQQQLQNTLHAQLQSALA
  GLGHEIRTVGRTLAEQLEVGIAKHIQELVGVRESVLPEDAILPLMKPLEV
801 ELCYMTNLVQENFSSLLTLLWTHLTLVLEAAASQRSSSLASNLKIAL
  QNLBICPHARGCGLPPKALHTATFOALQRLDLELQAASSRELIRKYFCRSI
901 QQQAETTSEELGAVTVKASYRASEQKLRVELLSASSLLPLDSNGSSOPFV
  QLTLEPRHHPFLAARETQKHKKDLHPLPDETTFEFLVPAEPCKRAGACLL
1001 LTVLDYDTLGADDEGEAFPLPLEVFPGLSGSEEPGEVPTRLPLITYPAN
  GDPILQLLEGRKGDREAQVFFVRLRRRRAQASQHALRPAP
    
```

C.



**Fig. 2. Identification of a GTP-Rab27A-binding protein in platelet cytosol as Munc13-4.** A, GST-loaded (lane 3) and GTP- $\gamma$ S-bound (lane 4) and GDP-bound (lane 5) GST-Rab27A-loaded glutathione beads were incubated with platelet cytosol at 4 °C for 1 h. GST-loaded (lane 1) and GST-Rab27A-loaded (lane 2) beads were also treated in the same way without the cytosol. After washing the beads, the bead-associated proteins were analyzed in a Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel as described under "Experimental Procedures." A protein band at 120 kDa (asterisk) was specifically detected in lane 4. B, the 120-kDa protein was analyzed by TOF-MS and identified as human Munc13-4 as described under "Experimental Procedures." Underlining indicates the peptides whose masses were matched with peptide masses detected by the TOF-MS analysis. C, the domain structures of Munc13-1-3 and Munc13-4 are shown.

prepared by incubation of glutathione-Sepharose beads with GST or pretreated GST-Rab27A at 4 °C for 1 h, followed by washing the beads with Buffer A three times. The coated beads were incubated with the platelet cytosol (30 mg of proteins) at 4 °C for 1 h, followed by washing the beads with Buffer A three times, and the bead-associated proteins were extracted by the SDS sample buffer. The samples were analyzed in a Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel (4–20% gradient gel; Daiichi Chemical).

**Cloning of Munc13-4**—The TOF-MS analysis of the GTP- $\gamma$ S-Rab27A-binding protein at 120 kDa was performed by Kyoto Science Co. (Kyoto, Japan). The report first showed that a candidate protein could be FLJ00067, which contained an incomplete sequence with possible introns and C-terminal deletion. We reconstituted the full-length sequence with several expressed sequence tags overlapping

with FLJ00067 and identified it as a human homologue of rat Munc13-4 (24). Using the sequences, we designed primers and amplified the full-length cDNA by PCR using the Marathon-Ready human bone marrow cDNA (Clontech). The PCR product was cloned into pENTR (Invitrogen) and verified by sequencing using a 3100 Genetic Analyzer.

**Anti-Munc13-4 and -Rab27 Antibodies**—cDNA encoding the N-terminal region of Munc13-4 (residues 1–262) was obtained by PCR and subcloned into pDEST17 (Invitrogen). The His<sub>6</sub>-Munc13-4 (1–262) protein was produced and purified as described above. Anti-Munc13-4 and anti-Rab27A rabbit polyclonal antibodies were generated using His<sub>6</sub>-Munc13-4 (1–262) and His<sub>6</sub>-Rab27A as antigens, respectively. The anti-Rab27A antibody recognized both Rab27A and Rab27B. For transient expression of Munc13-4, HeLa cells were transfected with pcDNA

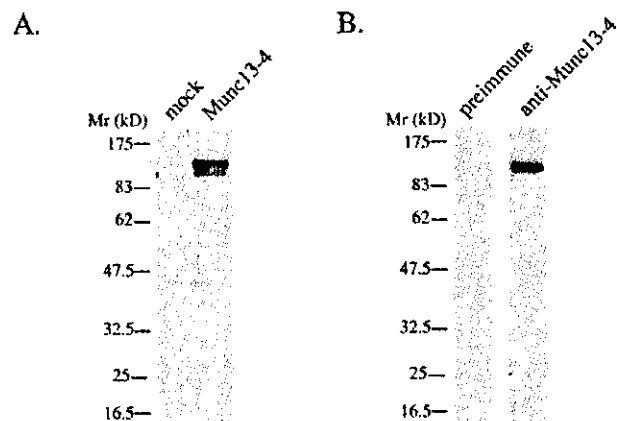
(Invitrogen) containing full-length Munc13-4 using LipofectAMINE (Invitrogen).

**Assay Analyzing Direct Interaction of Munc13-4 with Rab27**—Binding of Munc13-4 with small GTPases was carried out by affinity chromatography. Glutathione-Sepharose beads coated with GTP $\gamma$ S- or GDP-bound Rab GTPases (each 1  $\mu$ g) were prepared by incubation for 1 h at 4 °C in Buffer A. Then the prepared beads were incubated with purified 0.5  $\mu$ g of His<sub>6</sub>-Munc13-4 for 1 h at 4 °C in Buffer A and washed three times with Buffer A at 4 °C. Bead-associated His<sub>6</sub>-Munc13-4 was analyzed by immunoblotting with anti-Munc13-4 antibody.

**Density Gradient Separation of Platelet Organelles**—We first loaded [<sup>3</sup>H]serotonin into dense core granules of platelets from 50 ml of freshly obtained blood and permeabilized the platelets with SLO. Then, after centrifugation to remove most of cytosol and resuspension in 1 ml of Buffer A containing the ATP regeneration system, the platelets were disrupted by sonication and centrifuged at 600  $\times$  g for 5 min to remove unbroken platelets. The supernatant was layered on the top of metrizamide stepwise gradient (each 1.0-ml layer at 1.30–1.00 g/ml in density decreasing by each 0.03 g/ml from the bottom) in Buffer A containing the ATP regeneration system and centrifuged at 28,000 rpm with Beckman Rotor SW40 for 2 h at 4 °C as described (31). Aliquots of the fractions were analyzed by Western blot with indicated antibodies and counting radioactivity of [<sup>3</sup>H]serotonin. The separation of the membrane and cytosolic fraction was performed by centrifugation at 300,000  $\times$  g for 30 min at 4 °C after disrupting platelets by sonication or at 600  $\times$  g for 5 min after the SLO permeabilization of platelets.

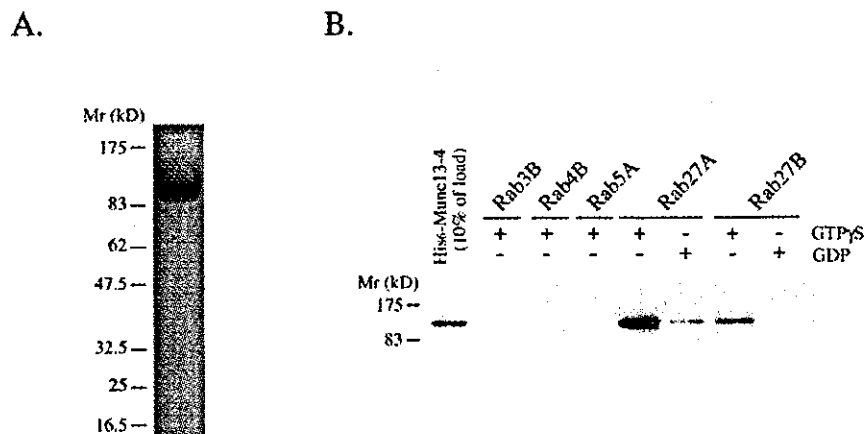
## RESULTS

**Unprenylated Rab27 Inhibits the Ca<sup>2+</sup>-induced Dense Core Granule Secretion**—In the present study, we used a previously



**FIG. 3. Anti-Munc13-4 antibody recognizes a single band at 120 kDa in platelet lysate.** A, Munc13-4- and mock-transfected HeLa cell lysates were immunoblotted with the anti-Munc13-4 antibody as described under "Experimental Procedures." B, platelet lysates were immunoblotted with preimmune serum and the anti-Munc13-4 antibody as described under "Experimental Procedures." The data shown are the representative of three independent experiments with similar results.

**FIG. 4. Direct interaction of recombinant Munc13-4 with GTP $\gamma$ S-Rab27 *in vitro*.** A, recombinant His<sub>6</sub>-Munc13-4 was produced and purified from the over-expressing Sf9 cells and analyzed by SDS-PAGE gel stained by Coomassie Blue as described under "Experimental Procedures." B, glutathione beads coated with GTP $\gamma$ S- or GDP-bound various GST-Rab GTPases (each 1  $\mu$ g) were incubated with His<sub>6</sub>-Munc13-4 (0.5  $\mu$ g) *in vitro*, and the bead-associated His<sub>6</sub>-Munc13-4 was detected by Western blotting with anti-His<sub>6</sub> antibody as described under "Experimental Procedures." Purified Munc13-4 used for the affinity analysis is also shown (10% of load). The data shown are representative of three independent experiments with similar results.



established *in vitro* assay system using SLO-permeabilized platelets by monitoring secreted [<sup>3</sup>H]serotonin preloaded into dense core granules (31, 32, 35). Agonists promote granule secretions by increasing intracellular calcium ion concentrations in platelets (36). Upon permeabilization of platelets the intracellular and extracellular concentrations of calcium are equal; therefore we used calcium chloride as a stimulus. In the assay, the secretion of the granules was reconstituted by the addition of ATP and exogenous platelet cytosol, and the response observed was equivalent to intact platelets in the time course and the Ca<sup>2+</sup> sensitivity (31, 32, 35).

Small GTPases produced in *E. coli* are not modified by the addition of prenyl groups at their C termini (37), which is essential for the correct localization and activity (2, 3, 38). Incubation of permeabilized platelets with Rab27A and Rab27B purified from *E. coli* inhibited the Ca<sup>2+</sup>-induced dense core granule secretion in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). Incubation of permeabilized platelets with other small GTPases such as Rab3B, Rab4B, Rab5A, or Rap1B, a Ras family small GTPase whose GTP-bound form has been shown to be increased upon platelet activation (39), had no effect (Fig. 1B), indicating that the effect of Rab27 is specific. We prepared and purified mutant Rab27A-T23N, which preferentially binds GDP, and Rab27A-Q78L, which lacks GTPase activity (40). Incubation of permeabilized platelets with Rab27A-Q78L, but not Rab27A-T23N, inhibited the secretion in a concentration-dependent manner (Fig. 1C). Inhibition by unprenylated Rab27A-Q78L, wild type Rab27A, and Rab27B could be due to sequestration of putative Rab27 effector molecules from endogenous membrane-associated GTP-Rab27 by forming nonfunctional complexes with effector proteins. These data demonstrate that Rab27 is involved in the regulation of dense core granule secretion in platelets.

**Identification of Munc13-4 as a GTP-Rab27-binding Protein in Platelet Cytosol**—To elucidate the mechanism of action of Rab27, we attempted to identify GTP-Rab27-binding proteins that might mediate the function of Rab27 in the granule secretion, from platelet cytosol by affinity chromatography. As shown in Fig. 2A, we detected one major protein migrating at ~120 kDa on GTP $\gamma$ S-GST-Rab27A beads (lane 4) but not on GDP-GST-Rab27A- (lane 5) or GST beads (lane 3). TOF-MS analysis of the protein and a data base search revealed that the 120-kDa protein was the human homologue of rat Munc13-4 (24) because most of the peptide masses obtained by the TOF-MS analysis were detected all over the human Munc13-4 molecule (Fig. 2B). Human Munc13-4 consists of 1,090 amino acids, and the primary structure is 88% identical to that of rat Munc13-4. As is the case with Munc13-1–3, Munc13-4 contains two calcium-binding C2 domains and Munc13 homology do-



A.

B.

SLO-permeabilized platelets

Sonicated platelets

whole sup ppt

whole sup ppt

- Munc13-4

- Munc13-4

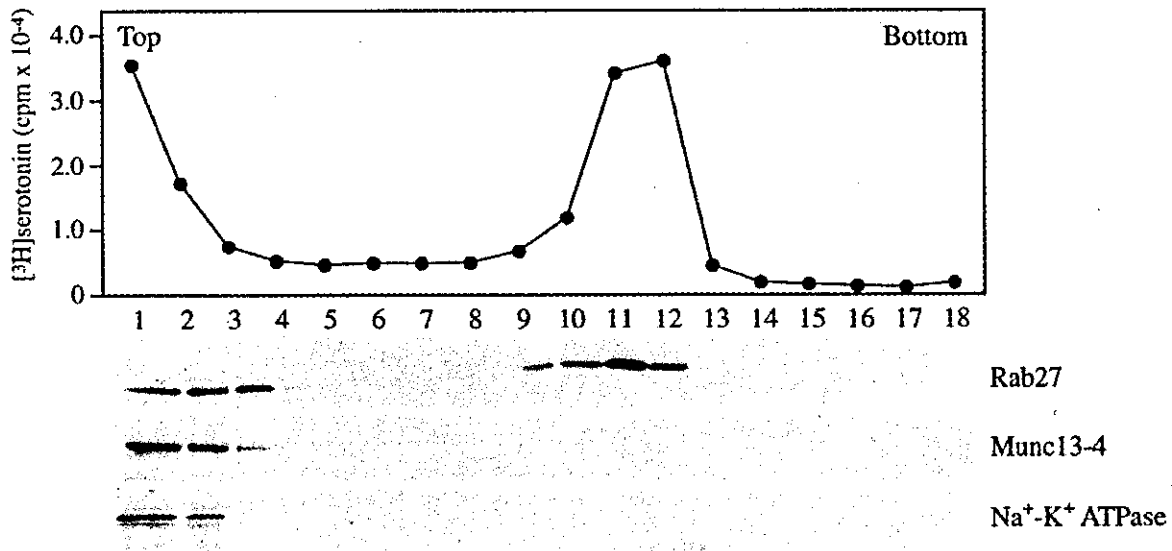
- PKCα

- PKCα

- Rab27

- Rab27

C.



**Fig. 5. Localization of Munc13-4 in platelet organelles.** *A* and *B*, after centrifugation of isolated platelets permeabilized with SLO for 30 min (*A*) or sonicated directly (*B*), comparable amounts of the supernatant (*sup*) and pellets (*ppt*) were analyzed by immunoblotting with anti-Munc13-4, anti-PKC $\alpha$ , and anti-Rab27 antibodies as described under "Experimental Procedures." The data shown are the representative of three independent experiments with similar results. *C*, after separation of organelles of [<sup>3</sup>H]serotonin-loaded permeabilized platelets by density gradient, [<sup>3</sup>H]serotonin was measured by a liquid scintillation counter and Munc13-4, Rab27, and Na,K-ATPase were detected by immunoblotting in each fraction as described under "Experimental Procedures." The data shown are the representative of three independent experiments with similar results.

mains, whereas Munc13-4 lacks the long N-terminal region containing a phorbol ester-binding C1 domain present in Munc13-1-3 (21, 24) (Fig. 2C).

We generated an antibody against the N-terminal region of human Munc13-4 (residues 1-262). The antibody recognized a 120-kDa protein in HeLa cells transfected with Munc13-4 but not in mock transfected cells (Fig. 3A). The antibody recognized a single band at 120 kDa in platelet lysate (Fig. 3B) and also the 120-kDa protein eluted from the GTP $\gamma$ S-GST-Rab27A-loaded affinity chromatography column (data not shown), confirming that the 120-kDa protein that we identified is indeed Munc13-4.

To examine whether the interaction of Munc13-4 with Rab27 is direct, we produced and purified full-length His<sub>6</sub>-Munc13-4 using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, recombinant Munc13-4 could bind directly to GTP $\gamma$ S-Rab27A but only slightly to GDP-Rab27A *in vitro*. Furthermore, Munc13-4 demonstrated a weaker interaction with GTP $\gamma$ S-Rab27B, compared with GTP $\gamma$ S-Rab27A. Importantly, Munc13-4 did not bind to GTP $\gamma$ S-Rab3B, -Rab4B, or -Rab5A (Fig. 4B). Thus, the interaction of Munc13-4 with Rab27 is direct, GTP-dependent, and specific.

*Localization of Munc13-4*—Munc13-1 has been demon-

strated to localize specifically to the presynaptic plasma membrane, although it does not contain a membrane-spanning region (20). Munc13-4 also lacks a transmembrane region. We examined the subcellular localization of Munc13-4 in platelets. As shown in Fig. 5A, Munc13-4 was equally distributed between the cytosolic and membrane fractions in SLO-permeabilized platelets, whereas Rab27 was exclusively membrane-associated. As expected, PKC $\alpha$  was found predominantly in the soluble supernatant fraction (Fig. 5A). When isolated platelets were directly sonicated and centrifuged at  $300,000 \times g$ , localization of Munc13-4, Rab27, and PKC $\alpha$  was similar to the results in the SLO-permeabilized platelets (Fig. 5B). Namely, ~50% of Munc13-4, most of Rab27, and a small part of PKC $\alpha$  were recovered in the pellet after the high speed centrifugation (Fig. 5B), suggesting a strong affinity of Munc13-4 to the membrane.

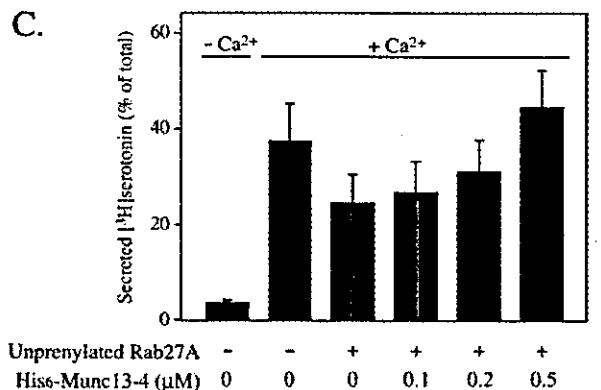
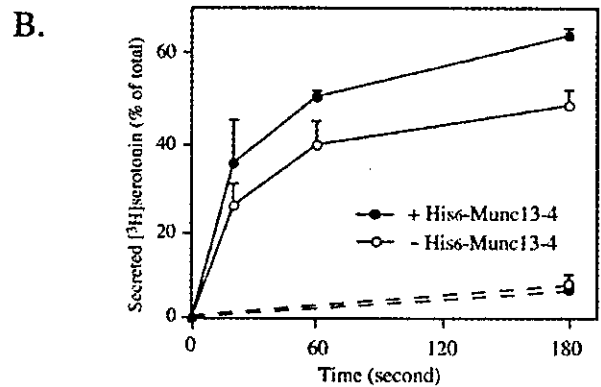
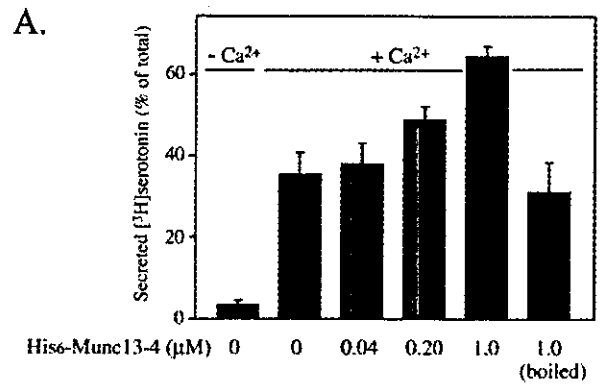
Next, we biochemically examined the localization of Rab27 and membrane-associated Munc13-4 in platelet organelles. We first loaded [ $^3$ H]serotonin into dense core granules of platelets and permeabilized the platelets with SLO. Then, after centrifugation to remove cytosol, the cytosol-depleted platelets were disrupted by sonication, and the low speed supernatant containing platelet organelles was separated by a density gradient method (31). As shown in Fig. 5C, [ $^3$ H]serotonin was recovered in two peaks. The lighter peak is presumably due to [ $^3$ H]serotonin leaking from the dense core granules. The heavier fractions of [ $^3$ H]serotonin indicate the presence of dense core granules. The majority of Rab27 was recovered together with fractions of dense core granules containing [ $^3$ H]serotonin, whereas some Rab27 was detected in the low density fractions where a plasma membrane marker Na,K-ATPase was recovered (Fig. 5C). Under these conditions, Munc13-4 was recovered in the lighter fractions together with Na,K-ATPase but not in the vesicle fractions (Fig. 5C), suggesting that Munc13-4 is on the plasma membrane but not on the dense core granules in platelets.

**Involvement of Munc13-4 in the Regulation of Dense Core Granule Secretion**—We finally examined whether Munc13-4 regulates dense core granule secretion in platelets using the semi-intact secretion assay. In basal conditions, SLO-permeabilized platelets retained a residual amount of membrane-associated Munc13-4 (Fig. 5A), and exogenously added platelet cytosol contained 80 nM Munc13-4. Under these conditions, the addition of purified Munc13-4 (Fig. 4A) enhanced the Ca $^{2+}$ -induced secretion of dense core granules in a concentration-dependent manner (Fig. 6A). The activity of Munc13-4 was abolished when Munc13-4 was denatured (Fig. 6A), suggesting that the activity was not due to a nonspecific effect of the buffer. The dense core granule secretion was time-dependent, and the addition of Munc13-4 not only accelerated the kinetics but also increased the amounts of the secretion (Fig. 6B). Importantly, the inhibition of secretion by unprenylated Rab27A was rescued by the addition of recombinant Munc13-4 in a concentration-dependent manner (Fig. 6C).

#### DISCUSSION

Here we have demonstrated that Rab27 regulates the Ca $^{2+}$ -induced dense core granule secretion in platelets by showing that the addition of unprenylated dominant active Rab27A, wild type Rab27A, and Rab27B but not other GTPases inhibited the secretion in permeabilized platelets. In addition, we identified Munc13-4 as a novel GTP-Rab27-binding protein. We further demonstrated that Munc13-4 mediates the function of GTP-Rab27 in the regulation of the secretion by showing that the addition of Munc13-4 enhanced the secretion and rescued the inhibition of secretion by unprenylated Rab27.

We have shown that the addition of unprenylated Rab27



**Fig. 6. Munc13-4 enhances the dense core granule secretion and rescues the inhibition by unprenylated Rab27A.** A, permeabilized platelets were first incubated with the indicated concentrations of Munc13-4, and the Ca $^{2+}$ -induced secretion of dense core granules for 1 min was analyzed in the standard assay condition by measuring secreted [ $^3$ H]serotonin preloaded in dense core granules as described under "Experimental Procedures." B, permeabilized platelets were first incubated in the absence (open circles) or the presence (closed circles) of 0.2  $\mu$ M Munc13-4 and then incubated with Ca $^{2+}$  at 20 nM (broken lines) or 20  $\mu$ M (solid lines) for the indicated periods. The Ca $^{2+}$ -induced secretion of dense core granules for indicated periods was analyzed as described under "Experimental Procedures." C, permeabilized platelets were first incubated in the absence or presence of unprenylated Rab27A at 2.0  $\mu$ M with various concentrations of Munc13-4. The Ca $^{2+}$ -induced secretion of dense core granules for 1 min was analyzed as described under "Experimental Procedures." The results shown are expressed as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

purified from *E. coli* inhibited the Ca $^{2+}$ -induced dense core granule secretion. In the secretion assay, added unprenylated Rab27 is theoretically unable to localize to the membrane and therefore would sequester Rab27 effector molecules by forming

nonfunctional complexes. Unprenylated Rab27A-T23N with preferential GDP binding would act as a dominant negative protein when expressed in cells (41). However, here we observed almost no effect of Rab27A-T23N on the dense core granule secretion in our semi-intact system (Fig. 1C). On the other hand, unprenylated GTPase-deficient mutant Rab27A-Q78L inhibited the secretion to a similar extent as wild type Rab27A and Rab27B. This could depend upon the ability of association with effector molecules of Rab27. The mechanism might be similar to that seen in the inhibition of the insulin signaling in adipocytes by overexpression of prenylation-deficient Rab4 (42). Thus, GTP-Rab27 is essential for dense core granule secretion in platelets once the granules are normally generated, although there is controversy concerning the role of Rab27 in dense core granule biogenesis (4, 13, 14).

To identify specific GTP-Rab27-binding protein(s) that may function in dense core granule secretion in platelets, we performed Rab27 affinity chromatography using platelet cytosol as the source for interacting proteins. We detected a GTP- $\gamma$ S-Rab27A-binding protein at 120 kDa and identified it as the human homologue of rat Munc13-4 (24) by TOF-MS analysis and a data base search. Recombinant Munc13-4 bound to purified Rab27A and Rab27B in their GTP- $\gamma$ S-bound forms *in vitro*, indicating that their interaction is direct and nucleotide-dependent.

So far, eight proteins have been identified as GTP-Rab27A-binding molecules (43, 44). Five of them contain the C-terminal tandem calcium-binding C2 domains (45) and are designated as synaptotagmin-like proteins (Slp 1-5) (43, 44). The other three are homologous to Slps but lack the C2 domains and are designated as Slp-lacking C2 domains (Slac2-a-c) (43). All of these molecules contain the Slp homology domain at their N-terminal ends, through which these molecules interact directly with GTP-Rab27 (43). Munc13-4 does not contain this Slp homology domain motif (43, 44). Therefore, we conclude that Munc13-4 is a novel type of GTP-Rab27-binding molecule.

We have demonstrated that the addition of recombinant Munc13-4 in the secretion assay accelerated the kinetics and increased secretion, indicating that Munc13-4 positively regulates dense core granule secretion in platelets. Importantly, the inhibitory effect of unprenylated Rab27A was rescued by the addition of recombinant Munc13-4. Exogenously added unprenylated Rab27A is presumed to form nonfunctional complexes with putative Rab27 effectors, thereby inhibiting secretion. Because exogenously added Munc13-4 overcomes inhibition by unprenylated Rab27, it is most likely that Munc13-4 mediates the function of GTP-Rab27 in the dense core granule secretion in platelets. Interestingly, the inhibitory effect of unprenylated Rab27A on the secretion was stronger than that of unprenylated Rab27B (Fig. 1A), which may reflect distinct roles of each isoform within the regulation of dense core granule secretion in platelets. Our data suggest that this difference is due to the stronger affinity of Rab27A to Munc13-4 than that of Rab27B (Fig. 4B).

Because SNAREs and Rab GTPases are key molecules in the regulation of vesicle transport, elucidation of the molecular mechanism of their cooperation could provide a clue for further understanding of vesicle docking/fusion. There have been several examples of Rab effector proteins interacting with the components of the SNARE machinery. For example, the Rab5 effector Rabenosyn-5 interacts directly with Vps45, a member of the Munc18/Sec1 family, in the regulation of endocytic membrane traffic (46). Similarly, the Ypt7 effector complex that controls vacuolar fusion in yeast interacts directly with Vps33, which is also a Munc18/Sec1 family protein (47). Thus, a group of Rab effectors appear to regulate SNARE pairing through

Munc18/Sec1 family proteins. Another group of Rab effectors has been shown to bind SNAREs directly, as shown for the Rab5 effector EEA1 interacting with syntaxin6 (48) and syntaxin13 (49).

It has also been demonstrated that Munc13-1 could be a direct regulator of syntaxin1 (50, 51) and that a GTP-Rab3A-binding protein, RIM1, which is a cytomatrix protein at the active zone in synapses, interacts with Munc13-1 (52). Thus, Rab3A might regulate Munc13-1 indirectly through interaction with RIM1. On the other hand, we here report the first direct link between Rab GTPases and a member of the Munc13 family, which may provide a novel mechanism for the control of SNARE activity by regulatory Rab GTPases. It will now be essential to explore the mechanisms of how Munc13-4 regulates the SNARE pairs that function in dense core granule secretion. In platelets, it has been shown that syntaxin2 mediates dense core granule secretion (53), suggesting that Munc13-4 might regulate syntaxin2.

We detected Munc13-4 in both cytosolic and membrane fractions, whereas Rab27 is exclusively in the membrane fraction (Fig. 5, A and B). Furthermore, by a density gradient separation, Munc13-4 was recovered in the plasma membrane fraction, whereas a major part of Rab27 was recovered in the granule fraction (Fig. 5C). Thus, the localization of Rab27 and Munc13-4 is not overlapping to a great extent. Munc13-4 on the plasma membrane may mark the target site for the dense core granule docking by interacting directly with activated Rab27 on the vesicle membrane. Because Rab3A is present on the synaptic vesicles (54) and its effector RIM1 and RIM1's partner Munc13-1 are on the presynaptic membrane in neurons (20), there might be a common regulatory mechanism used by the Rab GTPase-Munc13 system.

Taken together, the work presented here demonstrates that Rab27 regulates dense core granule secretion in platelets by employing the GTP-Rab27-binding protein, Munc13-4. Our current findings could provide a novel mechanism by which a Rab GTPase controls the regulated exocytosis through direct interaction with a Munc13 family protein. To contribute to further understanding of the regulation of vesicle transport, it is essential to elucidate the molecular mechanism of how the Rab27-Munc13-4 system promotes regulated exocytosis.

**Acknowledgments**—We are grateful to Dr. M. Zerial for providing plasmids containing Rab4 and Rab5, Dr. Y. Nozawa for a plasmid containing Rab27A, Dr. Y. Takai for a plasmid containing Rap1B and Rab3B, and Dr. K. Omori for providing an anti-Na,K-ATPase antibody. We are also grateful to the Kyoto Red Cross Blood Center for providing platelet pellets. We thank Dr. H. McBride (Ottawa, Canada) and Dr. C. Murphy (Ioannina, Greece) for critical reading of the manuscript and T. Matsubara for excellent technical assistance.

**Note Added in Proof**—Feldmann *et al.* (Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Charadin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blache, S., Le Deist, F., Fisher, A., and de Saint Basile, G. (2003) *Cell* 115, 461–473) have published that mutation in Munc13-4 causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3) where cytolytic granule fusion to the plasma membrane in cytotoxic T lymphocytes is impaired similar to mutation in Rab27A (11, 12), suggesting that the Rab27-Munc13-4 regulatory system may also function in regulated secretion in the cells.

#### REFERENCES

- Brass, L. F. (2000) in *Hematology: Basic Principles and Practice* (Hoffman, R. S., Benz, E. J., Furie, B., Cohen, H., and Silberstein, L. E., ed) 3rd Ed., pp. 1753–1770, Churchill Livingstone, New York
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 153–208
- Zerial, M., and McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117
- Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Zhang, Y., Novak, E. K., Swank, R. T., Russell, L. B., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7933–7938
- Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Hammer, J. A., III (2002) *Nat. Cell Biol.* 4, 271–278

6. Hume, A. N., Collinson, L. M., Hopkins, C. R., Strom, M., Barral, D. C., Bossi, G., Griffiths, G. M., and Seabra, M. C. (2002) *Traffic* **3**, 193–202
7. Provance, D. W., James, T. L., and Mercer, J. A. (2002) *Traffic* **3**, 124–132
8. Fukuda, M., Kuroda, T. S., and Mikoshiba, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12432–12436
9. Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002) *FEBS Lett.* **517**, 233–238
10. Kuroda, T. S., Ariga, H., and Fukuda, M. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 5245–5255
11. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G. M. (2001) *Immunity* **15**, 751–761
12. Haddad, E. K., Wu, X., Hammer, J. A., III, and Henkart, P. A. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 835–842
13. Novak, E. K., Gautam, R., Reddington, M., Collinson, L. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McGarry, M. P., and Swank, R. T. (2002) *Blood* **100**, 128–135
14. Barral, D. C., Ramalho, J. S., Anders, R., Hume, A. N., Knapton, H. J., Tolmacheva, T., Collinson, L. M., Goulding, D., Authi, K. S., and Seabra, M. C. (2002) *J. Clin. Invest.* **110**, 247–257
15. Chen, Y. A., and Scheller, R. H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 98–106
16. Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (1999) *EMBO J.* **18**, 4372–4382
17. Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L. C., Jr., and Scheller, R. H. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 247–252
18. Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., and Rettig, J. (2000) *EMBO J.* **19**, 3586–3596
19. Richmond, J. E., Weimer, R. M., and Jorgensen, E. M. (2001) *Nature* **412**, 338–341
20. Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., and Sudhof, T. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25273–25280
21. Augustin, I., Betz, A., Herrmann, C., Jo, T., and Brose, N. (1999) *Biochem. J.* **337**, 363–371
22. Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T. C., and Brose, N. (1999) *Nature* **400**, 457–461
23. Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J. S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9037–9042
24. Koch, H., Hofmann, K., and Brose, N. (2000) *Biochem. J.* **349**, 247–253
25. Akayama, M., Nakada, H., Omori, K., Masaki, R., Taketani, S., and Tashiro, Y. (1986) *Cell Struct. Funct.* **11**, 259–271
26. Palmer, M., Harris, R., Freytag, C., Kehoe, M., Tranum-Jensen, J., and Bhakdi, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 1598–1605
27. Nagata, K., Satoh, T., Itoh, H., Kozasa, T., Okano, Y., Doi, T., Kaziro, Y., and Nozawa, Y. (1990) *FEBS Lett.* **275**, 29–32
28. Matsui, Y., Kikuchi, A., Kawata, M., Kondo, J., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1010–1016
29. Matsui, Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11071–11074
30. Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K., and Zerial, M. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**, 6578–6585
31. Shirakawa, R., Yoshioka, A., Horiuchi, H., Nishioka, H., Tabuchi, A., and Kita, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33844–33849
32. Yoshioka, A., Shirakawa, R., Nishioka, H., Tabuchi, A., Higashi, T., Ozaki, H., Yamamoto, A., Kita, T., and Horiuchi, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 39379–39385
33. Fabiato, A., and Fabiato, F. (1979) *J. Physiol. (Paris)* **75**, 463–505
34. Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999) *Nature* **397**, 621–625
35. Yoshioka, A., Horiuchi, H., Shirakawa, R., Nishioka, H., Tabuchi, A., Higashi, T., Yamamoto, A., and Kita, T. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **947**, 403–406
36. Knight, D. E., and Scrutton, M. C. (1980) *Thromb. Res.* **20**, 437–446
37. Nuoffer, C., Peter, F., and Balch, W. E. (1995) *Methods Enzymol.* **257**, 3–9
38. Pereira-Leal, J. B., Hume, A. N., and Seabra, M. C. (2001) *FEBS Lett.* **498**, 197–200
39. Franke, B., Akkerman, J. W., and Bos, J. L. (1997) *EMBO J.* **16**, 252–259
40. Menasche, G., Feldmann, J., Houdusse, A., Desaymard, C., Fischer, A., Goud, B., and de Saint Basile, G. (2003) *Blood* **101**, 2736–2742
41. Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., and Seabra, M. C. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 795–808
42. Knight, J. B., Cao, K. T., Gibson, G. V., and Olson, A. L. (2000) *Endocrinology* **141**, 208–218
43. Kuroda, T. S., Fukuda, M., Ariga, H., and Mikoshiba, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 9212–9218
44. Kuroda, T. S., Fukuda, M., Ariga, H., and Mikoshiba, K. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 899–906
45. Newton, A. C., and Johnson, J. E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 155–172
46. Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., and Zerial, M. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 601–612
47. Price, A., Seals, D., Wickner, W., and Ungermann, C. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 1231–1238
48. Simonsen, A., Gaullier, J. M., D'Arrigo, A., and Stenmark, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28857–28860
49. McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999) *Cell* **98**, 377–386
50. Sassa, T., Harada, S., Ogawa, H., Rand, J. B., Maruyama, I. N., and Hosono, R. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 4772–4777
51. Brose, N., Rosenmund, C., and Rettig, J. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 303–311
52. Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., and Sudhof, T. C. (2002) *Nature* **415**, 321–326
53. Chen, D., Bernstein, A. M., Lemons, P. P., and Whiteheart, S. W. (2000) *Blood* **95**, 921–929
54. Matteoli, M., Takei, K., Cameron, R., Hurlbut, P., Johnston, P. A., Sudhof, T. C., Jahn, R., and De Camilli, P. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 625–633