

Title	Rho GTP交換因子GrinchGEFの細胞内局在と機能の解析
Author(s)	原, 崇之
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/52324">https://doi.org/10.18910/52324</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 原 崇 之 )

論文題名 Rho GTP交換因子GrinchGEFの細胞内局在と機能の解析

## 論文内容の要旨

## [ 背景、目的 ]

全ての組織は細胞を構成単位としているため、細胞機能の低下は様々な疾病発症の原因となる。例えば、細胞機能の低下に起因する現象として癌細胞の浸潤・転移過程が挙げられる。細胞は癌化に伴い増殖制御異常を惹起し、細胞極性、接着能を消失する。その後、原発巣から離脱した癌細胞は運動性を亢進し周囲組織に浸潤、転移を起こすと考えられている。この様に、細胞機能の低下は生体機能の低下要因となる。ここで細胞機能とは細胞極性、接着、運動等であり、それらは細胞内の細胞骨格因子により制御されている。さらに、細胞骨格因子の制御機構に中心的役割を担う分子が低分子量Gタンパク質Rhoファミリーである。Gタンパク質は三量体Gタンパク質と低分子量Gタンパク質に分類され、低分子量Gタンパク質はRho、Rab、Ras、Ran、Arfに分類される。また細胞内外における情報伝達は、GTP交換因子であるGEFにより活性化された低分子量Gタンパク質から生じるため、細胞の特異的動向を考える上でGEFの細胞内局在および機能を明らかにする事が重要となる。以上より、我々は細胞機能を理解する上で低分子量Gタンパク質Rhoファミリーの中でも特に細胞骨格因子制御に関連が深いRhoAに着目し、RhoAのGEFであるARHGEF10に主眼を置き先行研究を行った。先行研究の結果ARHGEF10は細胞内輸送系に関与する低分子量Gタンパク質RabファミリーであるRab6、Rab8と共局在し機能することが分かった。また、ARHGEF10には類似体であるGrinchGEFの存在が知られているが、その局在、機能はほとんど知られていない。ARHGEF10の理解を深める上でも類似体であるGrinchGEFの作用を知ることが非常に重要であると考えられたため、今回、細胞機能を制御する低分子量Gタンパク質RhoファミリーのGEFであるGrinchGEFを研究対象とし、ARHGEF10に加え、細胞輸送を制御する低分子量Gタンパク質RabファミリーであるRab6、Rab8をターゲット分子として解析を行った。

## [ 材料、方法 ]

## 1. 培養細胞

上皮系腫瘍細胞由来であるHeLa細胞、MDA-MB-231細胞を用いた。HeLa細胞は各分子の細胞内局在解析に用いた。MDA-MB-231細胞はHeLa細胞より運動性を有するため、細胞機能解析に用いた。

## 2. プラスミドコンストラクション

GrinchGEF、ARHGEF10の遺伝子をPCRで増幅した後、*EcoR I*/*Sal I*で切断しpCMV myc vectorに組み込んだ。GFP融合型Rab6、Rab8の観察には安定発現株を用いた。

## 3. トランスフェクション

Lipofectamine TM2000を用いて培養細胞へトランスフェクションを行った。

## 4. 免疫蛍光二重染色

培養細胞を4%PFA in PBS溶液で固定後、0.5%Triton in PBS溶液で処理し、ブロッキングを行った。一次抗体を二時間、二次抗体を二時間反応させヘキストを用いて核を染色した後、封入し共焦点顕微鏡にて観察した。

## 5. HeLa細胞における細胞骨格因子阻害剤によるARHGEF10、GrinchGEF、Rab8の局在観察

細胞骨格因子である微小管、アクチンフィラメントの重合阻害剤であるノコダゾール、サイトカラシンDを用いて、24ウェルプレートにて培養したHeLa細胞へそれぞれ1時間反応させた後、免疫蛍光二重染色にてARHGEF10、GrinchGEF、Rab8の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて観察した。

## 6. MDA-MB-231細胞における各因子ノックダウンによる細胞動態の観察

MDA-MB-231細胞にsiRNAをトランスフェクションしGrinchGEF、ARHGEF10、Rab8をノックダウンした後、細胞遊走能試験、細胞浸潤能試験、細胞接着能試験を行い細胞動態の観察を行った。

## 7. GrinchGEFのノックダウンによるゴルジ体の配置変化に対するsiRNAオフターゲット効果の検討

HeLa細胞においてGrinchGEFのノックダウンにより認められたゴルジ体の拡散配置に対してsiRNAオフターゲット効果の検討を行った。GrinchGEFをノックダウンしたHeLa細胞のsiRNAがターゲットとするmRNA配列にサイレント点変

異を導入した遺伝子をトランスフェクトし、GrinchGEFを再発現させるレスキュー実験を行い、培養細胞の核中心からゴルジ体配置範囲の角度を計測し、ゴルジ体の拡散度合を数値化し検討した。

[ 結果 ]

1. HeLa細胞におけるARHGEF10、GrinchGEF、Rab6、Rab8の局在

HeLa細胞においてARHGEF10はRab6、Rab8は小胞構造上にいて共局在を認めた。GrinchGEFはRab6と共局在は認めず、小胞構造状、チューブ様構造上にRab8との共局在を認めた。ノコダゾール処理において微小管形成を阻害するとARHGEF10では核周囲に集積するのに対し、GrinchGEFでは局在変化を認めなかった。サイトカラシンD処理においてアクチン重合を阻害するとARHGEF10の局在変化は認めなかったがGrinchGEFではRab8陽性のチューブ様構造上で局在増加を認めた。

2. MDA-MB-231細胞における各因子ノックダウンによる細胞動態の観察

細胞遊走能試験において、GrinchGEFノックダウン群では有意な低下を認め、ARHGEF10ノックダウン群、Rab8ノックダウン群では有意な変化は認めなかった。細胞浸潤能試験において、GrinchGEFノックダウン群では有意な変化を認めず、ARHGEF10ノックダウン群、Rab8ノックダウン群では有意な低下を認めた。細胞接着能試験においてはGrinchGEFノックダウン群、ARHGEF10ノックダウン群、Rab8ノックダウン群、それぞれに有意な変化は認めなかった。

3. HeLa細胞におけるGrinchGEFノックダウンによる細胞小器官の配置変化

細胞極性に細胞小器官の動態が関連していることからGrinchGEFのノックダウンによる細胞小器官の配置変化を観察した。コントロール群においてゴルジ体は核周囲に位置していたがGrinchGEFをノックダウンするとゴルジ体は拡散して配置していた。レスキュー実験を行った結果、点変異導入遺伝子をトランスフェクトした細胞ではゴルジ体の再集合を認めたため、ゴルジ体の拡散された配置はGrinchGEFのノックダウンによる特異的な細胞小器官の配置変化であることが確認された。

[ 考察 ]

1. Rho GTP交換因子GrinchGEFの細胞内局在

GrinchGEFはARHGEF10の様にゴルジ体から細胞膜間における分泌小胞上における局在ではなく、細胞膜付近にて輸送、返送経路におけるRab8陽性のチューブ様構造上に局在していると考えられた。

2. Rho GTP交換因子GrinchGEFの機能

ゴルジ体の拡散配置はGrinchGEFのノックダウン特異的に認め、それに伴い細胞の運動極性が喪失し、細胞遊走能が低下したと考えられた。GrinchGEFの機能として培養細胞における細胞遊走の調節が示されたため、多段階からなる癌転移過程においてGrinchGEFの関与が考えられた。

[ 結論 ]

培養細胞においてRhoファミリー低分子量Gタンパク質GrinchGEFはRab8のチューブ様構造上に局在することが示された。またGrinchGEF特異的siRNAによるGrinchGEFノックダウンにより培養細胞の遊走抑制を確認した。そのメカニズムの一つとしてGrinchGEFのノックダウンによるゴルジ体の拡散配置による細胞極性の異常が関与していることが示唆された。以上の結果より、GrinchGEFの発現阻害は培養細胞の遊走能に対して抑制的に作用することを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 原 崇 之 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 古郷 幹彦
	副 査	教授 野田 健司
	副 査	准教授 波多 賢二
	副 査	講師 野村 良太
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>本研究は、低分子量 G タンパク質の機能を明らかにする目的で上皮系腫瘍細胞由来である培養細胞に対して免疫蛍光二重染色、細胞アッセイによる細胞動態観察を行い、Rho GTP/GDP 交換因子 GrinchGEF の細胞内局在及び機能解析を行ったものである。その結果、GrinchGEF は培養細胞においてゴルジ体の構造維持機能を担い、細胞遊走の調節因子であることが示唆された。本論文は、GrinchGEF の細胞内局在及び細胞動態に関連する機能を理解する上で有益な知見を与えるものである。よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		