The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://doi.org/10.18910/52324
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Rho GTP 交換因子 GrinchGEF の
細胞内局在と機能の解析

2015 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻（口腔外科第一教室）

原　崇之

略語一覧

BSA：Bovine serum albumin

DMEM：Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS：Fetal bovine serum

GAP：GTPase activating protein

GEF：Guanine nucleotide exchange factor

GTP：Guanosine triphosphate

PBS：Phosphate buffered saline

PCR：Polymerase chain reaction

PFA：Paraformaldehyde

PMSF：Phenylmethylsulfonyl fluoride

siRNA：Small interfering RNA

緒言

全ての組織は細胞を構成単位として作られているため、細胞増殖、細胞間シグナル伝達等の細胞機能の低下は、様々な疾病発症の原因となる。例えば、細胞機能の低下により誘発される一つの現象として、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の異常を惹起し、細胞極性、細胞間接着能を消失する。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[1,2]。このように細胞の高次機能の低下は、生体レベルの機能低下を引き起こすこととなる。

ここで、細胞の高次機能とは細胞極性形成、細胞接着、細胞運動等であり、それらは細胞内におけるアクチンや微小管等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おいて中心的役割を担うとされるのがRho ファミリー低分子量 G タンパク質である。G タンパク質とはグアニンヌクレオチド結合タンパク質の略称で三量体 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 と各サブファミリーへと分類される。様々な細胞機能に関与するこれらの低分子量 G タンパク質は GDP/GTP 交換因子である GEF により、細胞内作用部位にて GDP 結合不活性型から GTP 結合活性型に変換され作用を示す。GTP 結合活性型の低分子量 G タンパク質に GTPase 活性化タンパク質である GAP が作用すると、

GDP 結合不活性型へ変化する。細胞内外におけるシグナル伝達は 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、細胞の特異的な動向を考える上で 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[3~14]。

哺乳類において約 20 種存在するとされる Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の中でも Cdc42、Rac1、RhoA についてよく研究されている。Cdc42 は糸状仮足（Filopodia）形成に関与し、Rac1 は膜状仮足（Lamellipodia）形成に関与する。RhoA はアクチンに作用し、ストレスファイバーや接着斑（Focal adhesion）の形成に関与する。これらの分子は協調して作用し、細胞前方である先導端における糸状仮足の形成から始まり、膜状仮足を形成して細胞体を移動させ、ストレスファイバーにより細胞後方である尾部を退縮させ細胞を遊走する[15,16]。

また、細胞遊走の方向性を決定づける因子として、細胞内における微小管、ゴルジ体等の細胞内小器官の配置が挙げられる。遊走細胞の核近傍において、進行方向に対し前方に形成された微小管中心から微小管の伸長、短縮が認められる。さらに、ゴルジ体は微小管のマイナス端に配置されているため、微小管の重合阻害が生じるとゴルジ体配置の異常が観察される。培養細胞は進行方向に対し核前方へゴルジ体を配置し、細胞前方へ効率よい分泌を可能にしている[17]。Cdc42、Rac1、RhoA は微小管中心の配置、微小管形成の安定化、それに伴うゴルジ体配

置の安定化に作用し、遊走細胞の極性形成にも関与している。その様な細胞機能を制御する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の作用の中で、形態変化や細胞遊走において膜成分を細胞局所に輸送する必要があるため、細胞内における輸送系との関わりが重要となる。

ここで、細胞内における輸送系に関与する分子が Rab ファミリー低分子量 G タンパク質である。Rab ファミリー低分子量 G タンパク質は哺乳類において約 60 種存在するとされ、細胞内における小胞輸送の制御に関与している [18)]。小胞輸送とは、供給側細胞内小器官膜の一部が出芽した後、分離し形成された輸送小胞が受容側細胞内小器官あるいは細胞膜に接着した後、融合するという輸送機構である [19,20)]。

以上の点を踏まえ、我々は細胞機能を理解する上で Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の中でも特に細胞骨格因子制御に関連が深い RhoA に着目した。さらに先行研究対象として RhoA の GEF である ARHGEF10 に主眼を置いた。ARHGEF10 の細胞内局在を解析した先行研究において ARHGEF10 が分泌小胞に局在し、Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の一種である Rab6、Rab8 と共局在する事が少しずつ理解されてきている [21)]。Rab6 とはゴルジ体、分泌小胞上に局在し、ゴルジ体から細胞膜への輸送に関与し、Rab6 依存的に分泌小胞上に局在する Rab8 とは分泌小胞の細胞膜融合に関与している事が明らかとな

っている[22]。以上の解析より、ARHGEF10 が Rab6、Rab8 と共局在を示すことから、ARHGEF10 はゴルジ体から細胞膜への輸送系にも関与していると考えられた（図 15）。また、ARHGEF10 には約 60%のアミノ酸相同性を有する類似体である GrinchGEF の存在が知られている[23]。しかし、GrinchGEF は RhoA サブファミリーに対する GEF であること以外その局在、機能は知られていないため、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。さらに、細胞が正常な細胞遊走、細胞極性を維持するためには細胞骨格因子の働きに加え、細胞内における小胞輸送が正常に行われる事が必須となるため、細胞機能を考える上で細胞内輸送の協調作用を切り離す事は出来ない。そこで今回、細胞機能を維持する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の GEF である GrichGEF を研究対象とし、その細胞内局在及び機能を明らかにするために、類似体である ARHGEF10 に加え、ARHGEF10 と共局在を示し細胞内輸送を維持する Rab ファミリー低分子量 G タンパク質である Rab6、Rab8 をターゲット分子として解析を行った。

材料と方法

1．培養細胞

上皮系腫瘍細胞由来である HeLa 細胞、MDA-MB-231 細胞を用い解析を行った。HeLa 細胞はヒト子宮頸癌由来の細胞であり、各分子の細胞内局在解析に用いた。MDA-MB-231 細胞はヒト乳腺癌由来細胞で、HeLa 細胞よりも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 の遺伝子（Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz, University Medical Center Goettingen, Germany より供与）を以下に示す Forward primer、Reverse primer を用いて PCR で増幅した後、制限酵素である *Eco*R I / *Sal* I (TOYOBO, Japan) にて切断し、pCMV myc vector、pEGFP-C2 vector に各々組み込みプラスミドを構築した。また PCR 条件、PCR 酵素は表 1 に示した。さらに PCR 産物は DNA シークエンスにて全塩基配列を同定し、PCR にて変異が生じていないことを確認した。

Forward primer：GGG GAATTC ATGGCTTCCTCCAACCCTCC – 3’

Reverse primer：GGG GTCGAC CTATAGCATCAAGGGCACCT – 3’

ARHGEF10 の cDNA（長瀬 隆弘氏、かずさ DNA 研究所、千葉、日本より供

与）を以下の Primer を用いて PCR にて増幅した後、GrinchGEF と同様にして、pCMV myc vector、pEGFP-C2 vector に組み込みプラスミドを構築した。

Forward primer：GGG GAATTC CATGGACCAGCGAGAGCCCCT – 3'

Reverse primer：GGG GTCGAC AATATATAAGTCGTCTCCCT – 3'

GFP 融合型 Rab6 と Rab8 の観察には HeLa 細胞における GFP 融合安定発現細胞株を用いて観察を行った。

3. トランスフェクション

トランスフェクション前日に 24 ウェルプレートへ HeLa 細胞、MDA-MB-231 細胞を、10%ウシ胎仔血清・FBS（Biowest, USA）を含む DMEM 1.0 g/L Glucose（Nacalai, Japan）を用いて 37℃、5%CO_2条件下で 2.5×10^4個/500μL 培養し、LipofectamineTM2000（Life Technologies, Germany）を用いて目的遺伝子を導入した。1μg/μL のプラスミド 0.5 μL と OPTI-MEM（Life Technologies, Germany）49.5 μL、LipofectamineTM2000, 1 μL と OPTI-MEM, 49 μL をそれぞれ混和し、室温にて 5 分間静置した。さらに上記のプラスミド+OPTI-MEM 溶液と LipofectamineTM2000-+OPTI-MEM 溶液を混和後、室温 20 分間静置し、1 ウェルあたり全量 100 μL をトランスフェクションした。

4．免疫蛍光二重染色

トランスフェクション後 24 時間経過した HeLa 細胞を 4%PFA in PBS にて 15 分間固定した。遮光状態で 0.5%TritonX-100 in PBS 溶液にて処理し、Blocking buffer（15 mg/ml BSA, 50 μM Glycine, 0.1% NaN_3 in PBS）にて 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体 2 時間、二次抗体 2 時間、ともに室温にて反応させた後、ヘキストを用いて核を染色、封入し OLYMPUS FV 1000-D 共焦点顕微鏡にて観察を行った。なお使用した抗体は Blocking buffer にて 100 倍希釈濃度として用いた。

・一次抗体：mouse-anti-myc-antibody（American type culture collection,USA）, rabbit-anti-Rab6-antibody, rabbit-anti-Rab8-antibody（Cell Signaling Technology, USA）, rat-anti-β-tubulin-antibody, mouse-anti-golgi-matrix protein-antibody（Sigma Aldrich, USA）, mouse-anti-ARHGEF10-antibody（精製抗体）

・二次抗体：mouse-anti-Dylight549 labeled-antibodies, mouse-anti-Alexa488 labeled-antibodies, rabbit-anti-Cy3 labeled-antibodies（Nacalai tesque, Japan）

5．Western blotting 法

トランスフェクション後 24 時間経過した HeLa 細胞を PBS にて洗浄し、Extract Buffer(25 mM Tris HCl(pH7.5), 1%TritonX100, 150 mM NaCl 0.1 mM PMSF）40 μl/well を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、タンパク質を採取し、SDS-sample buffer でサンプル化した。SDS-PAGE で分離した後、タンパク質をメンブレンに転写した。Bloking Buffer（3%スキムミルク in TBST）で 30 分間ブロッキングし、一次抗体を 2 時間、二次抗体を 2 時間、それぞれ反応させた。各タンパク質を ECL キット（Thermo, USA）を用いて検出した。

・一次抗体 : rabbit-anti--Rab8-antibody（Cell Signaling Technology, USA）, mouse-anti-monoclonal Anti-ß-Tubulin I antibody（Sigma Aldrich, USA）, mouse-anti-ARHGEF10-antibody（精製抗体）

・二次抗体 : rabbit-anti-HRP labeled-antibodies, mouse-anti-HRP labeled-antibodies（Sigma Aldrich, USA）

6. Reverse Transcription - PCR 法

HeLa 細胞に Control、GrinchGEF siRNA (#1)、GrinchGEF siRNA (#2)（各配列は下記「8. MDA-MB-231 細胞における各因子のノックダウンによる細胞動態の観察」の項目に記載）を各々トランスフェクションし、24 時間

経過した後、Sepasol – RNA I Super G（Nacalai tesque, Japan）を用いて、HeLa 細胞より total RNA を抽出した。抽出された total RNA から Random hexamers（TOYOBO, Japan）を Primer とし Revers Transcription – PCR を行い、cDNA を合成した。また PCR 条件、PCR 酵素は表 2 に示した。

7. Quantitative – PCR 法

Reverse Transcription - PCR 法にて合成した cDNA、以下に示す Forward primer、Reverse primer を用い Quantitative – PCR 法を行った。また PCR 条件、PCR 酵素は表 3 に示した。なお、RNA 発現量は GAPDH を用いて相対定量を行った。

Forward primer：TGTGAGACGTTGACGGAGGAC – 3’

Reverse primer：TGGCACAGACAAGCATGTCG – 3’

8. 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としてノコダゾール、サイトカラシン D が報告されている [24~27]。それぞれの重合阻害剤を用い ARHGEF10、GrinchGEF、Rab8 の局在を観察した。24 ウェル

プレートにて 37℃、5%CO_2条件下で培養した HeLa 細胞に対して、20 μM ノコダゾール（Sigma Aldrich, USA）または 4 mg/L サイトカラシン D（Sigma Aldrich, USA）を各ウェルに 1 μl 滴下し、37℃、5%CO_2条件下で 1 時間反応させた後、免疫蛍光二重染色にて観察した。

9. MDA-MB-231 細胞における各因子の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。各細胞動態試験結果は、コントロールにおける値を 1 とした相対値としてグラフ化した。

各 siRNA 配列を下記に示した。

・Control

sense：CCA CAA AAA GCA ACU UUC UTT – 3’

antisense：AGA AAG UUG CUU UUU GUG GTT – 3’

・GrinchGEF siRNA（#1）

sense：CCU AUG ACA AGG ACA AUG UTT – 3’

antisense：ACA UUG UCC UUG UCA UAG GTG – 3’

・GrinchGEF siRNA（#2）

sense：GCU UCA UGG UGG UUU UCA UTT – 3’

antisense：AUG AAA ACC ACC AUG AAG CTA – 3’

・ARHGEF10 siRNA（#4）

sense：GGA AAC UAU CAG AAC UUA ATT – 3’

antisense：UUA AGU UCU GAU AGU UUC CTT – 3’

・ARHGEF10 siRNA（#5）

sense：GCA GAG AAG UUA AAU GAA ATT – 3’

antisense：UUU CAU UUA ACU UCU CUG CTT – 3’

・Rab8 siRNA

sense：GAC AAG UUU CCA AGG AAC GTT – 3’

antisense：GGU UCC UUG GAA ACU UGU CTT – 3’

siRNA のトランスフェクションは MDA-MB-231 細胞を 24 ウェルプレートに培養してから 24 時間後に行った。さらにトランスフェクションから 24 時間後に細胞動態試験を行った。

ｉ）Migration assay：細胞遊走能試験

48 ウェルケモタキシスチャンバー（Funakoshi, Japan）にコラーゲン Type Ⅰ（BD Biosciences, USA）にて処理したポアサイズ 8 μm メンブレン

（Neuro Probe, USA）を用い、GrinchGEF をノックダウンした MDA-MB-231 細胞を 2.5×10^5個加えた。37℃、5%CO_2条件下で 3 時間培養した細胞を 4%PFA in PBS にて固定し、ギムザ染色を行い遊走細胞数にて評価した。

ⅱ）Invasion assay：細胞浸潤能試験

12 ウェルプレート（Thermo, Denmark）にマトリジェル（BD Biosciences, USA）にて処理したトランスウェル（BD Falcon, USA）を用い、GrinchGEF をノックダウンした MDA-MB-231 細胞を 2.0×10^5個加えた。37℃、5%CO_2の条件下にて 24 時間培養した細胞を 4%PFA in PBS で固定し、ギムザ染色を行い浸潤細胞数にて評価した。

ⅲ）Adhesion assay：細胞接着能試験

96 ウェルプレート（Thermo, Denmark）にコラーゲン Type I （BD Biosciences, USA）処理を行い、GrinchGEF をノックダウンした MDA-MB-231 細胞を 2.0×10^4個加えた。 37℃、 5%CO_2の条件下にて 1 時間培養した細胞を 0.5%クリスタルバイオレットにて染色し PBS にて洗浄後、マイクロプレートリーダー（BIO RAD, USA）にて 590nm の吸光度を測定して接着細胞能を評価した。

10. GrinchGEF のノックダウンによるゴルジ体の配置変化に対する siRAN 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。オフターゲット効果とは siRNA による非特異的な遺伝子の発現抑制効果であり、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（5'-AGCTTCATGGTGGTTTTC-3'）にサイレント点変異（5'-AGTTTTATGGTAGTATTT-3'）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、ImageJ ソフトを用いて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[28)]。

11. 統計処理

統計処理として、二群間比較には Student-t 検定を用いた。コントロール群と各群の二群間比較には Williams 多重比較検定を用いた。結果は平均値±標準偏差で示し、危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判断した。

結果

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

局在の形態として直径 1μm 程度の独立する顆粒を小胞構造、連続する顆粒をチューブ様構造と定義した。HeLa 細胞において内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab6 は小胞構造上にて共局在を示した（図 1A）。さらに内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab8 は小胞構造上にて共局在を認めた（図 1B）。一方 GFP-GrinchGEF と内在性 Rab6 は共局在を認めなかった（図 2A）。また GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 は小胞構造上にて共局在を認めた（図 2B）。さらに GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 の一部はチューブ様構造上での共局在を認めた（図 2C）。ここで ARHGEF10、GrinchGEF は細胞骨格制御因子であることから、細胞骨格を構成する微小管、アクチンフィラメントに着目した。微小管の重合阻害剤であるノコダゾールを用いて GFP-ARHGEF10、GFP-GrinchGEF の局在を確認し、アクチンフィラメントの重合阻害剤であるサイトカラシン D を用いて、GFP-ARHGEF10、GFP-GrinchGEF、内在性 Rab8 の局在を確認した。GFP-ARHGEF10 はノコダゾール処理前では、細胞膜付近にその局在が確認され、ノコダゾール処理後では核周囲に集積する変化を認めた（図 3A）。一方、GFP-GrinchGEF の細胞膜付近における局在は、ノコダゾール処理前後での変化は認めなかった

（図 3B）。続いて、サイトカラシン D 処理前後の GFP-ARHGEF10、GFP-GrinchGEF、内在性 Rab8 の局在を観察した。ここでアクチンフィラメントの重合阻害を行うと Rab8 のチューブ様構造が増加することが報告されている[29]。GFP-ARHGEF10、内在性 Rab8 の細胞膜付近における共局在はサイトカラシン D 処理前後での変化を認めなかった（図 4）。一方、GFP-GrinchGEF、内在性 Rab8 の共局在は、サイトカラシン D 処理後における内在性 Rab8 のチューブ様構造増加に伴い、GFP-GrinchGEF との共局在の増加が観察された（図 5）。サイトカラシン D 処理前後における GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 の共局在数増減に対して、GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 の共局在を認めた数を内在性 Rab8 の総数で除した割合において評価した。その結果サイトカラシン D 処理前では 17%、サイトカラシン D 処理後では 48%を示したため内在性 Rab8 と GFP-GrinchGEF の共局在数増加と判断した。（図 6）

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

GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 の共局在が示されたため続いて、MDA-MB-231 細胞において GrinchGEF ノックダウン（#1、#2）、ARHGEF10 ノックダウン（#4、#5）、Rab8 ノックダウンにおける細胞動態を観察した。な

お GrinchGEF と Rab6 は共局在を認めないため、Rab6 は細胞動態観察の対象として除外した。GrinchGEF　siRNA#1、GrinchGEF siRNA#2 は Reverse Transcription – PCR 法と Quantitative – PCR 法にて siRNA ノックダウン効果が認められる事を確認した（図 7A）。ARHGEF10 siRNA#4、ARHGEF10 siRNA#5、Rab8 siRNA は Western blotting 法にて siRNA ノックダウン効果が認められる事を確認した（図 7B）。Western blotting 法にはローディングコントロール抗体として抗 β-チューブリンを用いた。

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（図 8）。また、MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞遊走能試験結果におけるギムザ染色像を示した（図 9）。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（図 10）。また、MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞浸潤能試験結果におけるギムザ染色像を示した（図 11）。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（図 12）。

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

細胞運動には細胞小器官の局在が関連していることが報告されている事から、GrinchGEF ノックダウンによるゴルジ体の配置変化を観察した[30]。コントロール群においてゴルジ体は核周囲に配置していたが、GrinchGEF をノックダウンするとゴルジ体の拡散配置が観察された（図 13A）。HeLa 細胞の核中心からゴルジ体配置範囲の角度計測を行い、ゴルジ体の拡散度合を計測した（図 13B）。また、角度計測の結果はドットチャートとしてグラフ化した。その結果、コントロール群では平均が 80.6 度、GrinchGEF ノックダウン群では平均 254.7 度となり、角度計測によって GrinchGEF ノックダウンによりゴルジ体が拡散することを確認した（図 14A）。一方、サイレント点変異を導入した遺伝子を用いたレスキュー実験の結果は GrinchGEF をノックダウンし、GrinchGEF が再発現していない細胞では平均 233.9 度となり、GrinchGEF をノックダウンし、その後 GrinchGEF を再発現した細胞では平均 119.5 度となった（図 14B）。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 GrichGEF の細胞内局在

ARHGEF10 は Rab6、Rab8 と小胞構造上での共局在を認め、GrinchGEF は Rab8 と小胞構造上ならびにチューブ様構造上での共局在を認めた。サイトカラシン D 処理にてアクチンフィラメントの重合阻害を行うと GinchGEF と Rab8 のチューブ様構造上での共局在の増加を認めたものの、小胞構造上での共局在に変化は認めなかった。以上より GrinchGEF は Rab8 陽性のチューブ様構造上に局在すると考えられた。またノコダゾール処理にて微小管形成を阻害したところ ARHGEF10 の局在に変化を認めたが、GrinchGEF の局在に変化は認めなかった。ここで微小管形成阻害時の細胞においてゴルジ体は拡散して配置することが報告されている [31)]。GrinchGEF の局在は細胞小器官の配置変化に関わらず変化は認めないことから、GrinchGEF は ARHGF10 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、細胞膜付近における輸送経路において 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（図 15）。

2. Rho GTP 交換因子 GrinchGEF の機能

細胞動態試験において GrinchGEF ノックダウン群では細胞遊走能の低下

を認めたが、細胞浸潤能、細胞接着能に変化は認めなかった。通常、細胞は方向性を持った動向を示し、ゴルジ体は進行方向に局在することが報告されている[32~38]。今回の細胞動態試験結果及びsiRNAレスキュー実験結果より、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。また、細胞浸潤にはコラーゲンをはじめとする細胞外基質を分解する MMP 等が必要となるが、GrinchGEF ノックダウン群では細胞浸潤能に変化は認めなかった事から、それらのプロテアーゼ発現に異常は認めなかったと考えられた。さらに、GrinchGEF ノックダウン群において細胞遊走能と細胞浸潤能が相反する結果となった要因の一つとして試験時間の違いが挙げられる。今回の細胞動態試験における測定時間は、細胞遊走能試験で 3 時間、細胞浸潤能試験で 24 時間とした。GrinchGEF ノックダウン群では細胞の極性喪失に伴い運動の方向性を失うが、細胞は静止する事なく遊走し、時間経過に伴い目的となる細胞外基質へと接着し、浸潤作用を示したと考えられた。また、GrinchGEF と共局在を示した Rab8 のノックダウン群では細胞遊走能に変化を認めず、細胞浸潤能の低下を認めた。これは GrinchGEF ノックダウン群と相反する結果であり、今回の実験においては GrinchGEF の機能発現は共局在する Rab8 の影響に関与しないと考えられた。一方、GrinchGEF の

類似体であるARHGEF10ノックダウン群の細胞動態試験はRab8ノックダウン群と同様の細胞動態試験結果を示していた。以上より GrinchGEF と ARHGEF10は局在の違いとともに、異なる作用経路における細胞機能への関与が示唆された。

また、癌細胞の転移過程として、癌細胞の増殖から始まり、間質への浸潤及び脈管内への侵入、さらに遊走、転移部位への接着を経て転移巣増殖を引き起すと考えられている[1,2]。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。現在、癌細胞の浸潤・転移に関与する様々なタンパク質や遺伝子が網羅的に解析されているなかで、今後、シグナル伝達機構である Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が種々の癌における診断マーカー、予後予測因子あるいは分子標的治療としての発展、応用が期待されると考えられた。

3. Rho GTP 交換因子 GrinchGEF の細胞内局在と機能の関連

GrinchGEF の Rab8 陽性チューブ様構造上への局在と、細胞遊走を制御する機能との関連について考察した。

細胞内における分泌経路は小胞による輸送系で結ばれている。それらは供

給側からの出芽によって形成された小胞が受容側において融合する事で輸送 が完了する。輸送経路には細胞内から細胞外への輸送経路であるエキソサイトーシスと細胞外から細胞内への輸送経路であるエンドサイト―シスに分けられる。また、細胞膜から取り込まれた物質は初期エンドソームにて選別を受けた後、分解経路またはリサイクル経路を通過する。ここでリサイクル経路として、初期エンドソームから細胞膜へ至る経路と、リサイクリングエンドソームを通過し細胞膜へ至る経路が存在するが、いずれのリサイクル経路においても物質はチューブ様構造状の膜担体により輸送されることが知られている。リサイクル経路の目的は、細胞外からの取り込みに利用される受容体を分解することなく、再合成を不要とすることで効率的な輸送を実現する事と考えられる[19,20]。ここでリサイクリングエンドソームにはRabファミリー低分子量Gタンパク質であるRab8の局在が認められる[39]。

また細胞骨格は、細胞形態維持、細胞運動、細胞内の物質輸送等に関与している。細胞骨格制御因子であるRhoファミリー低分子量G タンパク質等の作用により、糸状仮足（Filopodia）、膜状仮足（Lamellipodia）、ストレスファイバーを形成し細胞運動を可能にしている。細胞運動において、遊走細胞の先導端にて細胞外基質と接着し、遊走細胞の尾部にて細胞と細胞外基質間結合を切離し進行方向へと移動する事から、遊走細胞では進行方向へと膜成

分を供給することが重要となる[15,16]。そのため、短時間で膜成分を輸送するためには輸送経路としてリサイクル経路を用いることが効率的であると考えられる。

以上の輸送と機能の観点から、GrinchGEF は ARHGEF10 の様にゴルジ体から細胞膜への輸送経路ではなく、Rab8 陽性のチューブ様構造リサイクリングエンドソームに局在し、細胞遊走時における細胞先導端への膜成分輸送、細胞尾部における細胞と細胞外基質間結合の切離を効率よく行う役割を担うと考えられた。さらに、細胞恒常性の維持を担う因子として、細胞機能を制御する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質と細胞輸送を制御する Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の協調作用が重要であると考えられた。

総括

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。

本論文の一部は、第 59 回日本口腔外科学会総会（2014 年 10 月・千葉）および第 90 回解剖学会近畿支部学術集会（2014 年 11 月・大阪）にて発表した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病院病態制御学講座 古郷幹彦 教授（口腔外科第一教室）、大阪大学大学院 医学研究科 検査技術科学専攻 神生体情報学講座 稲垣忍 教授（神経生物学教室）に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました、大阪大学大学院 医学研究科 検査技術科学専攻 神生体情報学講座 柴田理志 助教（神経生物学教室）に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂きました大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病院病態制御学講座（口腔外科第一教室）、大阪大学大学院 医学研究科 検査技術科学専攻 神生体情報学講座（神経生物学教室）の教室員の皆様に、厚く御礼申し上げます。

最後に、私の研究生活を様々な面で支えてくれた家族に心より感謝致します。

引用文献

1) Thiery JP1. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.

2) Liotta LA. Tumor invasion and metastases Role of the extracellular matrix : Rhoads, memorial award lecture. *Cancer Res*. 1986 Jan;46(1):1-7.

3) Nassar N, Hoffman GR, Manor D, Clardy JC, Cerione RA.. Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nature Struct Biol.* 1998 Dec;5(12):1047-52.

4) Zhu G, Zhai P, Liu J, Terzyan S, Li G, Zhang XC. Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature Struct Mol Biol.* Oct;11(10):975-83.

5) Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997 Sep 15;11(18):2295-322.

6) Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998.Jan 23;279 (5350):509-14.

7) Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulationof the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. Annu Rev Biochem. 1999;68:459-86.

8) Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 2007 Jan;24(1):203-16.

9) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.*2001. Jan;81(1):153-208.

10) Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K. Small GTP-binding Protein Rho Stimulates the Actomyosin System,leading to Invasion of Tumor Cells. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5146-54.

11) Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K. Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res.* Apr 15;59(8): 2004-10.

12) Albizu L , Moreno JL, González-Maeso J,Sealfon SC. Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neuro-therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Nov;9(5):636-50.

13) Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. Eur J Endocrinol. 2001 Nov;145(5):543-59.

14) Matsushita T, Ashikawa K, Yonemoto K, Hirakawa Y, Hata J, Amitani H, Doi Y, Ninomiya T, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M, Nakamura Y,

Kiyohara Y, Kubo Y. Functional SNP of ARHGEF10 confers risk of atherothrombotic stroke. *Hum Mol Genet*. 2010 Mar 15;19(6):1137-46.

15) Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.

16) Rottner K, Stradal TE. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Oct;23(5):569-78.

17) Deakin NO, Turner CE. Paxillin inhibits HDAC6 to regulate microtubule acetylation, Golgi structure, and polarized migration. *J Cell Biol.* 2014 Aug 4;206(3):395-413.

18) Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):107-17.

19) Ohbayashi N, Fukuda M. Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics. *J Biochem*. 2012 Apr;151(4):343-51.

20) Taguchi T. Emerging roles of recycling endosomes. *J Biochem*. 2013 Jun;153(6):505-10.

21) Shibata S. The function of ARHGEF10 is related to the localizing of Rab8. in preparation.

22) Grigoriev I1, Yu KL, Martinez-Sanchez E, Serra-Marques A, Smal I,

Meijering E, Demmers J, Peränen J, Pasterkamp RJ, van der Sluijs P, Hoogenraad CC, Akhmanova A. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. Curr Biol. 2011 Jun 7;21(11):967-74.

23) Winkler S, Mohl M, Wieland T, Lutz S. GrinchGEF—A novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 7;335(4):1280-6.

24) Rogalski, AA, Bergman J E, Singer SJ. Effect of microtubule assembly status on the intracellular processing and surface expression of an integral protein of the plasma membrane. *J Cell Biol*. 1984 Sep;99(3):1101-9.

25) Rogalski AA. Singer SJ. Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J Cell Biol*. 1984 Sep;99(3):1092-100.

26) Ho WC, Allan VJ, van Meer G, Berger EG, Kreis TE. Reclustering of scattered Golgi elements occurs along microtubules. *Eur J Cell Biol*. 1989 Apr;48(2):250-63.

27) Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987 Oct;105(4):1473-8.

28) Bisel B, Calamai M, Vanzi F, Pavone FS. Decoupling Polarization of the Golgi Apparatus and GM1 in the Plasma Membrane. *PLoS One*. 2013 Dec 2;8(12):e80446.

29) Hattula K, Furuhjelm J, Tikkanen J, Tanhuanpää K, Laakkonen P, Peränen J. Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J Cell Sci*. 2006 Dec 1;119(Pt 23):4866-77.

30) Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.

31) Minin AA. Dispersal of Golgi apparatus in nocodazole-treated fibroblasts is a kinesindriven process. J Cell Sci. 1997 Oct;110 (Pt 19):2495-505.

32) Bergmann JE, Kupfer A, Singer SJ. Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Mar;80(5):1367-71.

33) Keller P, Simons K. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci.* 1997 Dec;110 (Pt 24):3001-9.

34) Yadav S, Puri S, Linstedt A . A primary role for Golgi positioning in

directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell.* 2009 Mar;20(6):1728-36.

35) Fölsch H1. The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol.* 2005 Apr;15(4):222-8.

36) Zhao M, Pu J, Forrester JV, McCaig CD. Membrane lipids, EGF receptors,and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J.* 2002 Jun;16(8):857-9.

37) Bershadsky AD, Futerman AH. Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A blocks cell polarization and inhibits directed cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 7;91(12):5686-9.

38) Prigozhina NL, Waterman-Storer CM. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol.* 2004 Jan 20;14(2):88-98.

39) Henry L, Sheff DR. Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):2059-68.

図表凡例

表１　GrinchGEF のプラスミドコンストラクションにおける PCR 条件

A：GrinchGEF の遺伝子を Temprate とし、Forward primer、Reverse primer、2mM dNTP、25mM $MgSO_4$、KOD、10×KOD Buffer、DW（滅菌水）を使用した。上記の PCR 酵素は全て TOYOB 社,Japan 製品を使用した。

B：PCR 反応条件は 94℃,2 分から開始し、PCR cycle setting を 94℃,15 秒、58℃,30 秒、68℃,5 分として 35cycle とした。Final extension を 68℃,7 分とし、反応終了後は 4℃にて冷却した。

表２　Reverse transcription – PCR 条件

A：抽出した RNA を Temprate とし Randam hexamer primer、10mM dNTP、Rnase inhibitor、Rever Tra Ace、Depec water を使用した。上記の PCR 酵素は全て TOYOBO 社、Japan 製品を使用した。

B：PCR 反応条件は 30℃,10 分から開始し、42℃,60 分、99℃,5 分と設定した。

表３　Quantitative – PCR 条件

A：Reverse transcription – PCR にて合成した cDNA、Forward primer、Reverse primer、Premix、DW（滅菌水）を使用した。

上記の PCR 酵素は全て TOYOBO 社、Japan 製品を使用した。

B：PCR 反応条件は 95℃,30 秒から開始し、95℃,5 秒、60℃,20 秒を 49 Cycle とした。

図１　HeLa 細胞における ARHGEF10 と Rab6 及び Rab8 の発現

HeLa 細胞の免疫蛍光二重染色像を示した。GFP 融合型 Rab ファミリーと内在性 ARHGE10 を発現し、その局在を検討した。

A：内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab6 の細胞内局在を示した。

内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab6 は共局在を認めた。

B：内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab8 の細胞内局在を示した。

内在性 ARHGEF10 と GFP-Rab8 は共局在を認めた。

図２　HeLa 細胞における GrinchGEF と Rab6 及び Rab8 の発現

HeLa 細胞の免疫蛍光二重染色像を示した。GFP 融合型 GrinchGEF を発現し、内在性 Rab6 及び Rab8 の局在を検討した。

A：GFP-GrinchGEF と内在性 Rab6 の細胞内局在を示した。

GFP-GrinchGEF と内在性 Rab6 は共局在を認めなかった。

B：GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 の細胞内局在を示した。

GFP-GrinchGEF と内在性 Rab8 は小胞構造上、チューブ様構造上にて共局在を認めた。

図 3　HeLa 細胞におけるノコダゾール処理前後の ARHGEF10 及び Grinch-GEF の局在

HeLa 細胞の免疫蛍光二重染色像を示した。GFP 融合型 ARHGE10、GFP 融合型 GrinchGEF を発現し、ノコダゾール処理前及びノコダゾール処理 1 時間後の局在をそれぞれ比較した。

GFP-ARHGEF10 はノコダゾール処理前後にて局在変化を認め、GFP-GrinchGEF はノコダゾール処理前後に局在変化を認めなかった。

図 4　HeLa 細胞におけるサイトカラシン D 処理前後の ARHGEF10 及び Rab8 の局在

HeLa 細胞の免疫蛍光二重染色像を示した。GFP 融合型 ARHGE10 を発現し、サイトカラシン D 処理前及びサイトカラシン D 処理 1 時間後における内在性 Rab8 の局在をそれぞれ比較した。

GFP-ARHGEF10 と内在性 Rab8 の共局在に変化は認めなかった。

図 5　HeLa 細胞におけるサイトカラシン D 処理前後の GrinchGEF 及び Rab8 の局在

HeLa 細胞の免疫蛍光二重染色像を示した。GFP 融合型 GrinchGEF を発現し、サイトカラシン D 処理前及びサイトカラシン D 処理 1 時間後における内在性 Rab8 の局在をそれぞれ比較した。

内在性 Rab8 チューブ様構造増加に伴い、GFP-GrinchGEF との共局在数増加を認めた。

図 6　サイトカラシン D 処理前後における GrinchGEF と Rab8 の共局在割合

サイトカラシン D 処理前後における GrinchGEF と Rab8 の共局在数増減に対して、GrinchGEF と Rab8 の共局在を認めた数を Rab8 の総数で除した割合において評価した結果、サイトカラシン D 処理前では 17%、サイトカラシン D 処理後では 48%を示したため Rab8 と GrinchGEF の共局在数増加と判断した。

図 7　siRNA ノックダウン効果の確認

A : GrinchGEF　siRNA#1、GrinchGEF siRNA#2 は Reverse Transcription – PCR 法と Quantitative – PCR 法にて siRNA ノックダウン効果が認められる事を確認した。

B : ARHGE10 siRNA#4、ARHGE10 siRNA#5、Rab8 siRNA は Western blotting 法にて siRNA ノックダウン効果が認められる事を確認した。なお Western blotting 法にはローディングコントロール抗体として抗 β-チューブリン（α-β-Tubulin）を用いた。

図 8　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞遊走能試験結果

MDA-MB-231 細胞において GrinchGEF ノックダウン群（#1、#2）、

ARHGEF10 ノックダウン群（#4、#5）、Rab8 ノックダウン群における細胞遊走能試験結果を示した。コントロールにおける値を 1 とした相対値としてグラフ化した。

GrinchGEF ノックダウン群では有意な低下を認め、ARHGE10 ノックダウン群、Rab8 ノックダウン群では有意な変化を認めなかった。

図 9　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞遊走能試験結果におけるギムザ染色像

コントロール群、GrinchGEF ノックダウン群（#1、#2）、 ARHGEF10 ノックダウン群（#4、#5）、Rab8 ノックダウン群におけるメンブレン上におけるギムザ染色像を示した。

図 10　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞浸潤能試験結果

MDA-MB-231 細胞において GrinchGEF ノックダウン群（#1、#2）、ARHGEF10 ノックダウン群（#4、#5）、Rab8 ノックダウン群における細胞浸潤能試験結果を示した。コントロールにおける値を 1 とした相対値としてグラフ化した。

GrinchGEF ノックダウン群では有意な変化を認めず、ARHGE10 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。

図 11　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞浸潤能試験結果

におけるギムザ染色像

コントロール群、GrinchGEF ノックダウン群（#1、#2）、 ARHGEF10 ノックダウン群（#4、#5）、Rab8 ノックダウン群におけるメンブレン上におけるギムザ染色像を示した。

図 12　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの細胞接着能試験結果

MDA-MB-231 細胞において GrinchGEF ノックダウン群（#1、#2）、ARHGEF10 ノックダウン群（#4、#5）、Rab8 ノックダウン群における細胞接着能試験結果を示した。コントロールにおける値を 1 とした相対値としてグラフ化した。

GrinchGEF ノックダウン群、ARHGE10 ノックダウン群、Rab8 ノックダウン群、それぞれに有意な差は認めなかった。

図 13　HeLa 細胞におけるゴルジ体の配置(緑：微小管､赤：ゴルジ体､青：核)

HeLa 細胞における免疫二重染色像また、その模式図を示した。

A：Control 及び GrinchGEF ノックダウンによるゴルジ体の配置

GrinchGEF ノックダウン群にてゴルジ体の拡散配置が観察された。

B：細胞の核中心からゴルジ体配置範囲の角度計測（α）（模式図）

HeLa 細胞の核中心からゴルジ体配置範囲の角度計測を行い、ゴルジ体の拡散度合を計測した。

図 14　HeLa 細胞におけるゴルジ体配置の角度計測結果

HeLa 細胞におけるゴルジ体配置の角度計測結果はドットチャートとしてグラフ化した。それぞれの平均値、また Control 群における最大角度値を点線にてグラフ上に示した。

A : Contorol 群、GrinchGEF ノックダウン群におけるゴルジ体配置の角度計測結果

ゴルジ体の拡散度合を数値化し評価した。

B : GrinchGEF をノックダウン後 GrinchGEF を再発現した細胞群（GrinchGEF 再発現あり群）および GrinchGEF をノックダウン後 GrinchGEF が再発現していない細胞（GrinchGEF 再発現なし群）のゴルジ体配置の角度計測結果

ゴルジ体の拡散配置は GrinchGEF ノックダウン特異的に認めた。

図 15　GrinchGEF の細胞内局在および輸送経路（模式図）

ARHGEF10 は Rab6、Rab8 と共局在を示し、ゴルジ装置から細胞膜への輸送系に関与していると考えられた。GrinchGEF は Rab8 陽性のチューブ様構造上に局在し、細胞膜付近における輸送経路に関与していると考えられた。

A

Primer(10μM)	Forward	1.5μℓ
	Reverse	1.5μℓ
Temprate		1μℓ
2mM dNTP		5μℓ
25mM MgSO4		2μℓ
KOD		1μℓ
10×KOD Buffer		5μℓ
DW		33μℓ
total		50μℓ

B

94℃	2′	
94℃	15″	35cycle
58℃	30″	
68℃	5′	
68℃	7′	
4℃	∞	

表 1　GrinchGEF のプラスミドコンストラクションにおける PCR 条件

A

Primer:Random hexamer(25pmol)	0.5μℓ
Temprate:抽出RNA	2μℓ
10mM dNTP	1μℓ
RNase Inhibitor	0.5μℓ
Rever Tra Ase	0.5μℓ
5×Buffer	2μℓ
Depec water	3.5μℓ
total	10μℓ

B

▼ 30℃ 10′
▼ 42℃ 60′
▼ 99℃ 5′

表 2　Reverse transcription – PCR 条件

A

Premix(qPCR syber)		10μℓ
Primer(100μM)	Forward	0.04μℓ
	Reverse	0.04μℓ
cDNA		1μℓ
DW		8.92μℓ
total		20μℓ

B

▼	95℃	30″	
▼	95℃	5″	49cycle
▼	60℃	20″	

表 3　Quantitative – PCR 条件

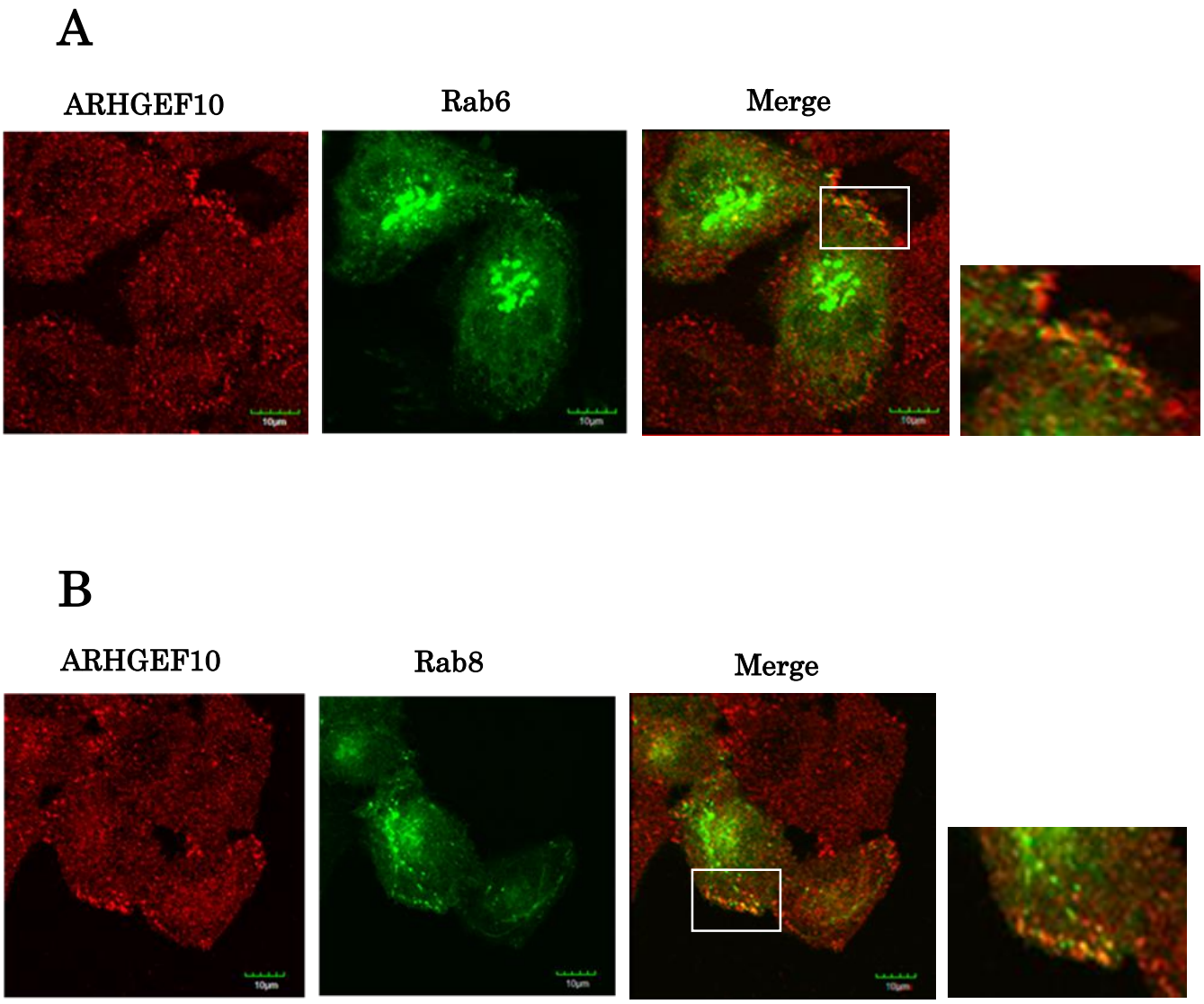


図 1　HeLa 細胞における ARHGEF10 と Rab6 及び Rab8 の発現

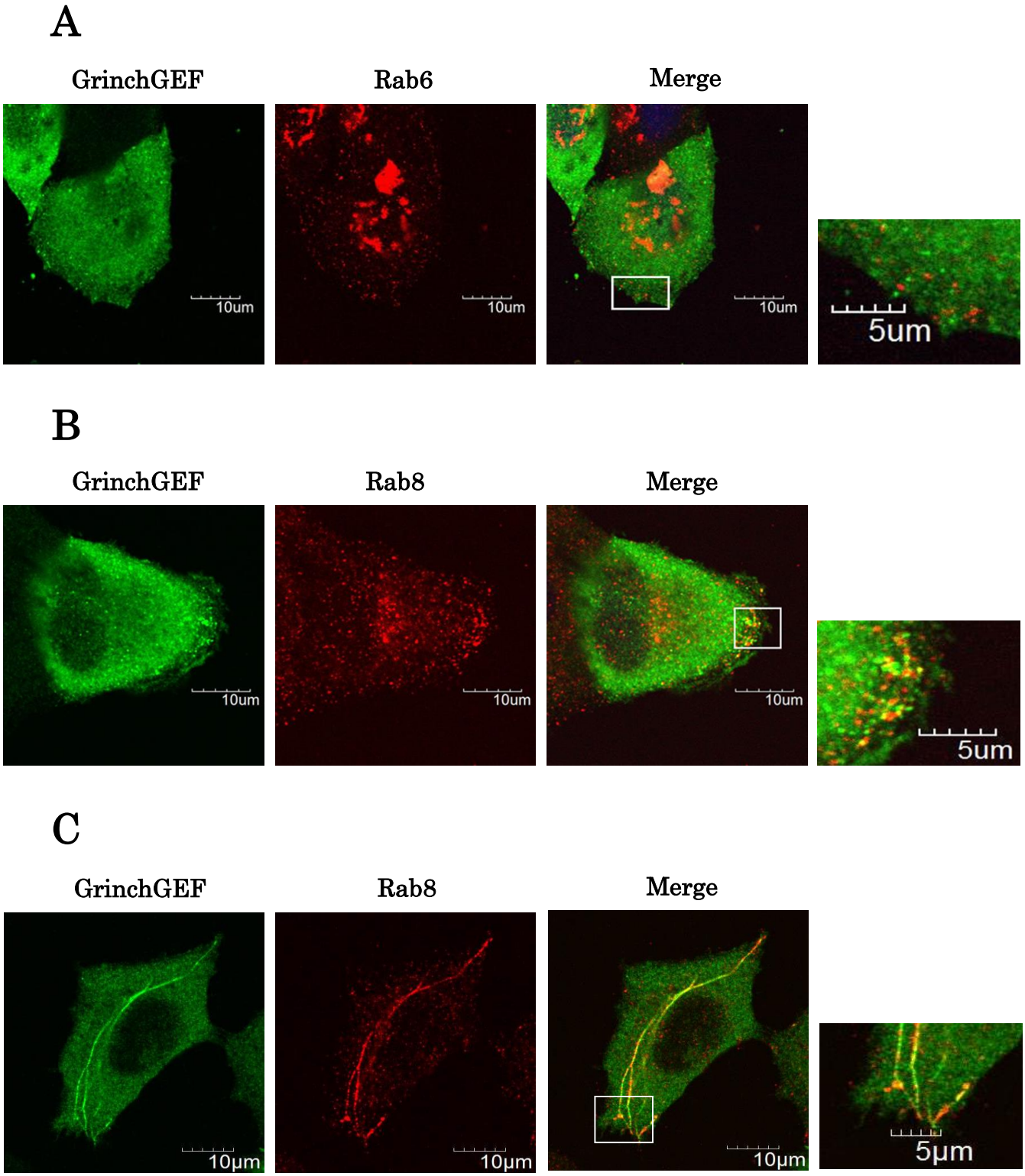
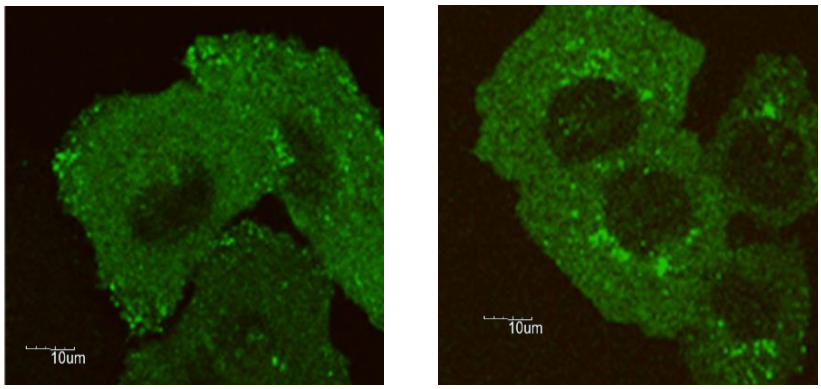


図 2　HeLa 細胞における GrinchGEF と Rab6 及び Rab8 の発現

A

ノコダゾール処理前　　ノコダゾール処理後

ARHGEF10



B

ノコダゾール処理前　　ノコダゾール処理後

GrinchGEF

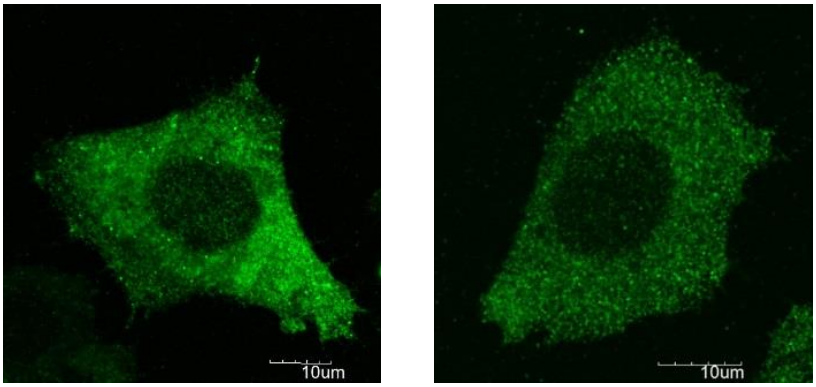
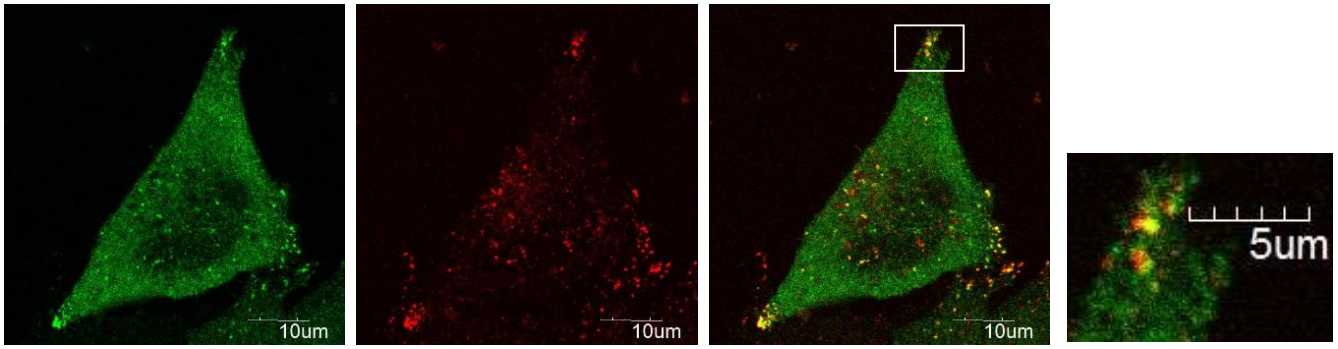


図 3　HeLa 細胞におけるノコダゾール処理前後の
ARHGEF10 及び GrinchGEF の局在

サイトカラシン D 処理前

ARHGEF10　　Rab8　　Merge



サイトカラシン D 処理後

ARHGEF10　　Rab8　　Merge

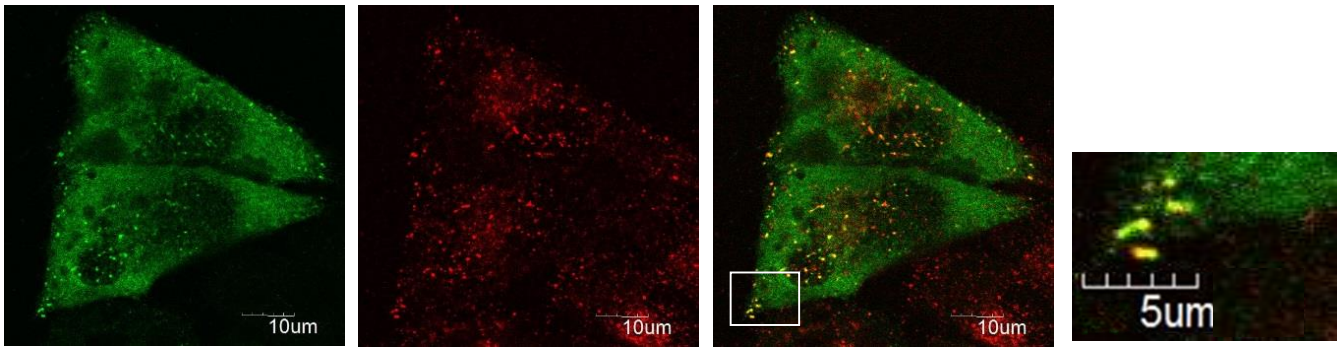
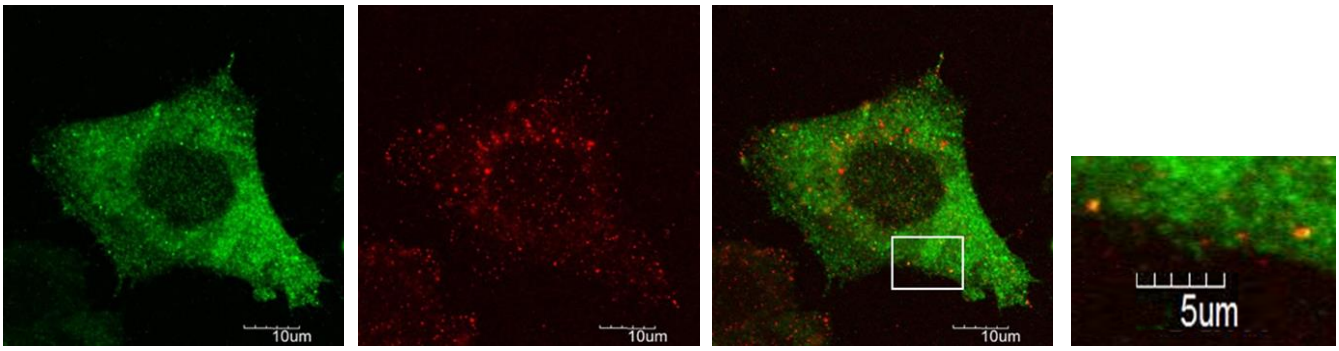


図 4　HeLa 細胞におけるサイトカラシン D 処理前後の
ARHGEF10 及び Rab8 の局在

サイトカラシン D 処理前

GrinchGEF　　Rab8　　Merge



サイトカラシン D 処理後

GrinchGEF　　Rab8　　Merge

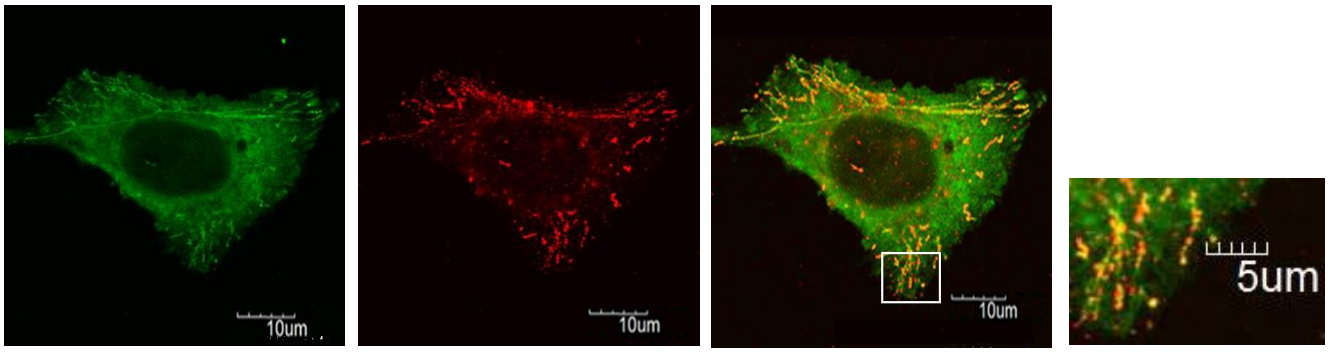


図 5　HeLa 細胞におけるサイトカラシン D 処理前後の
GrinchGEF 及び Rab8 の局在

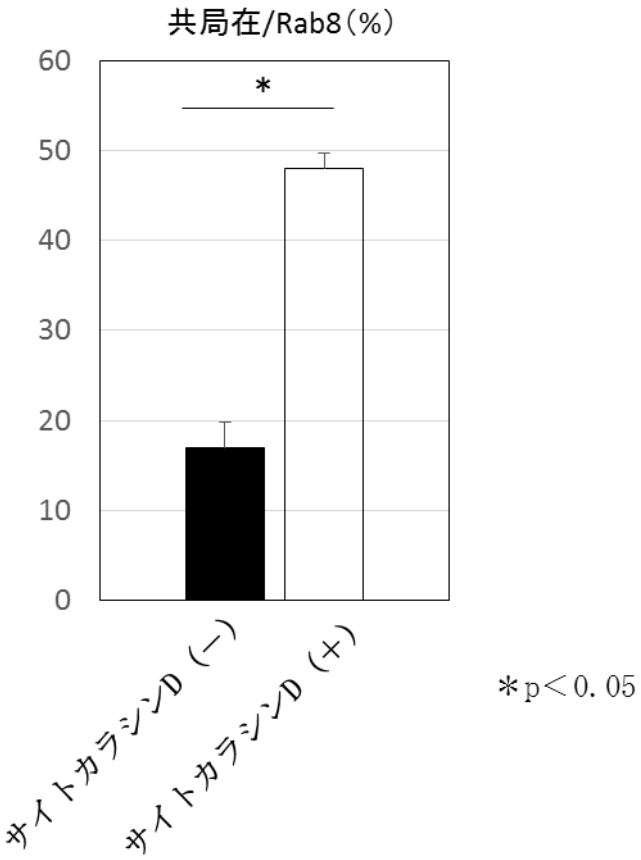
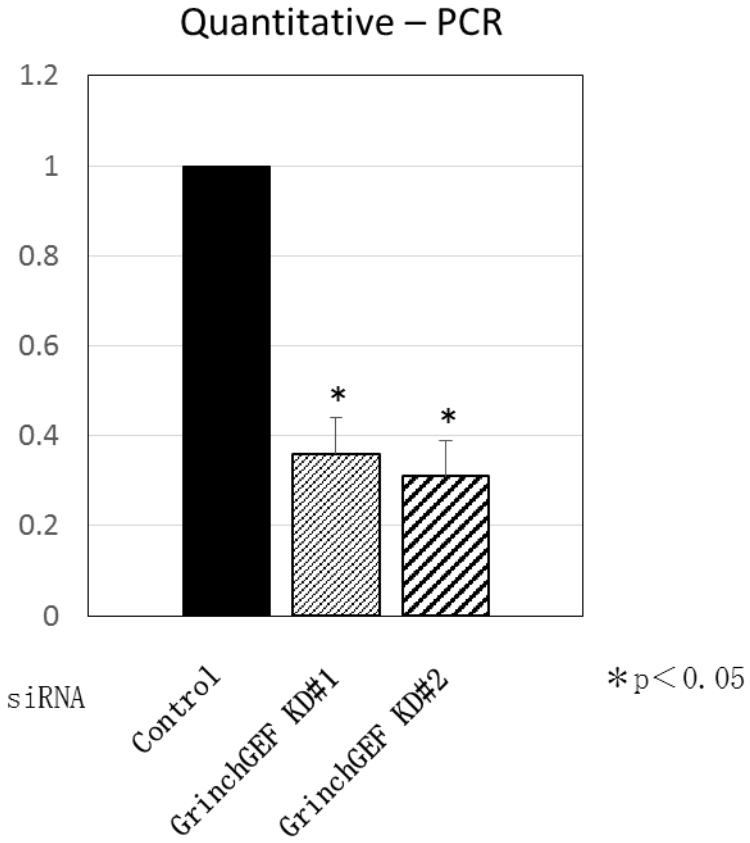


図 6　サイトカラシン D 処理前後における
GrinchGEF と Rab8 の共局在割合

A



B

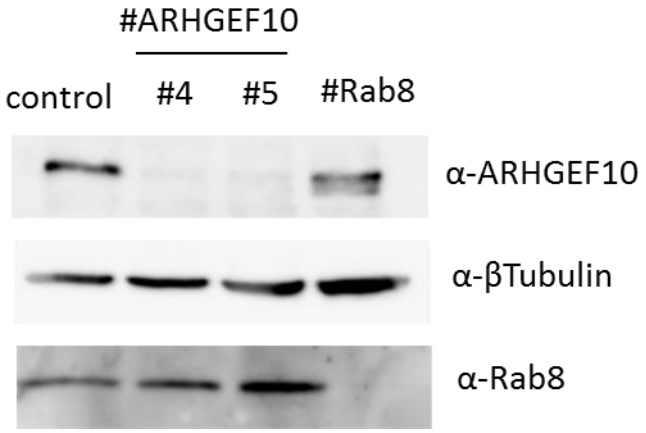


図 7　siRNA ノックダウン効果の確認

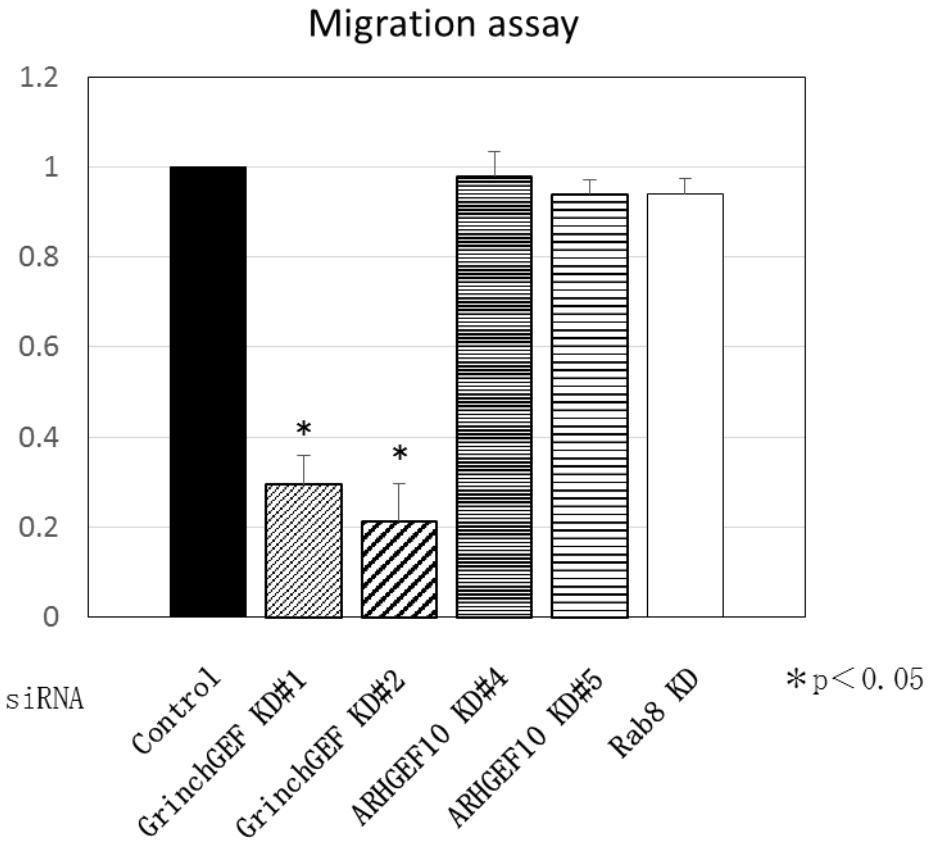


図 8　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの
細胞遊走能試験結果

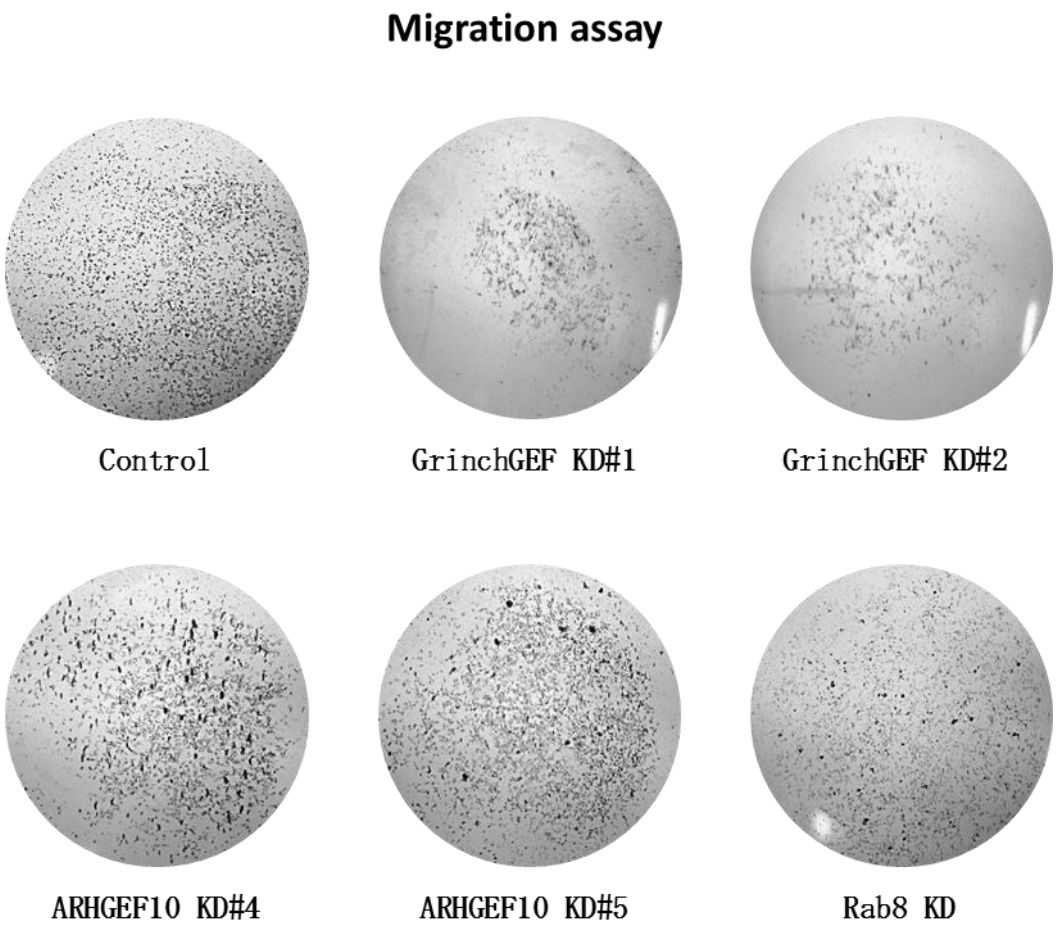


図 9　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの
細胞遊走能試験結果におけるギムザ染色像

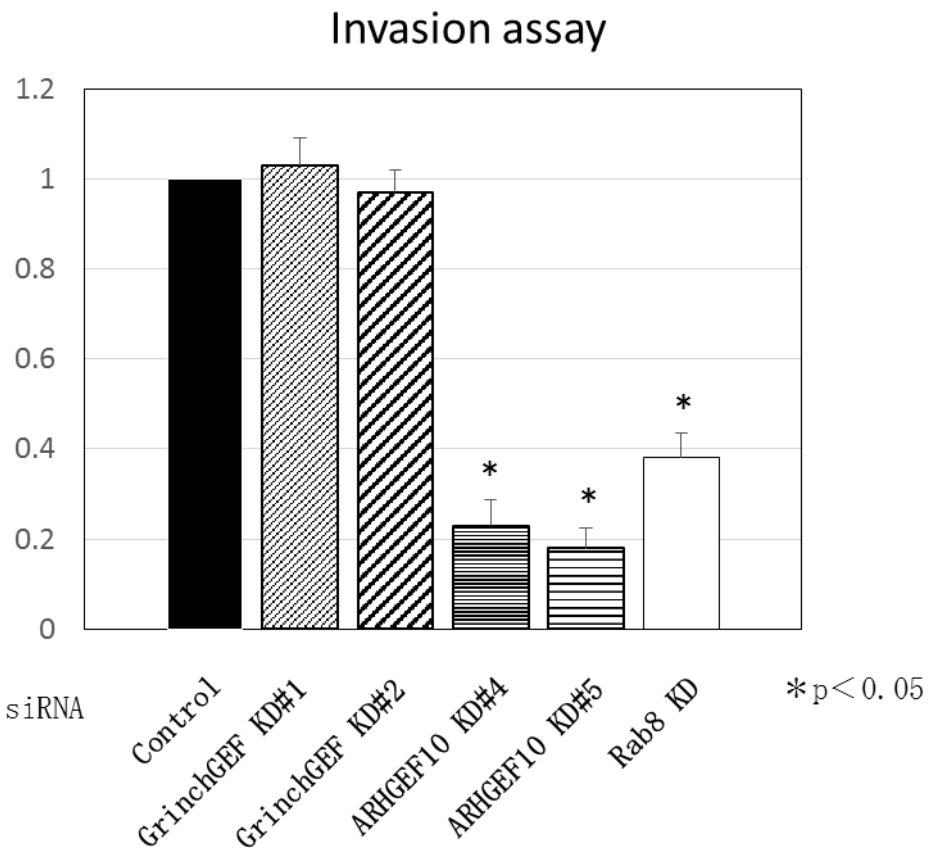


図 10　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの
細胞浸潤能試験結果

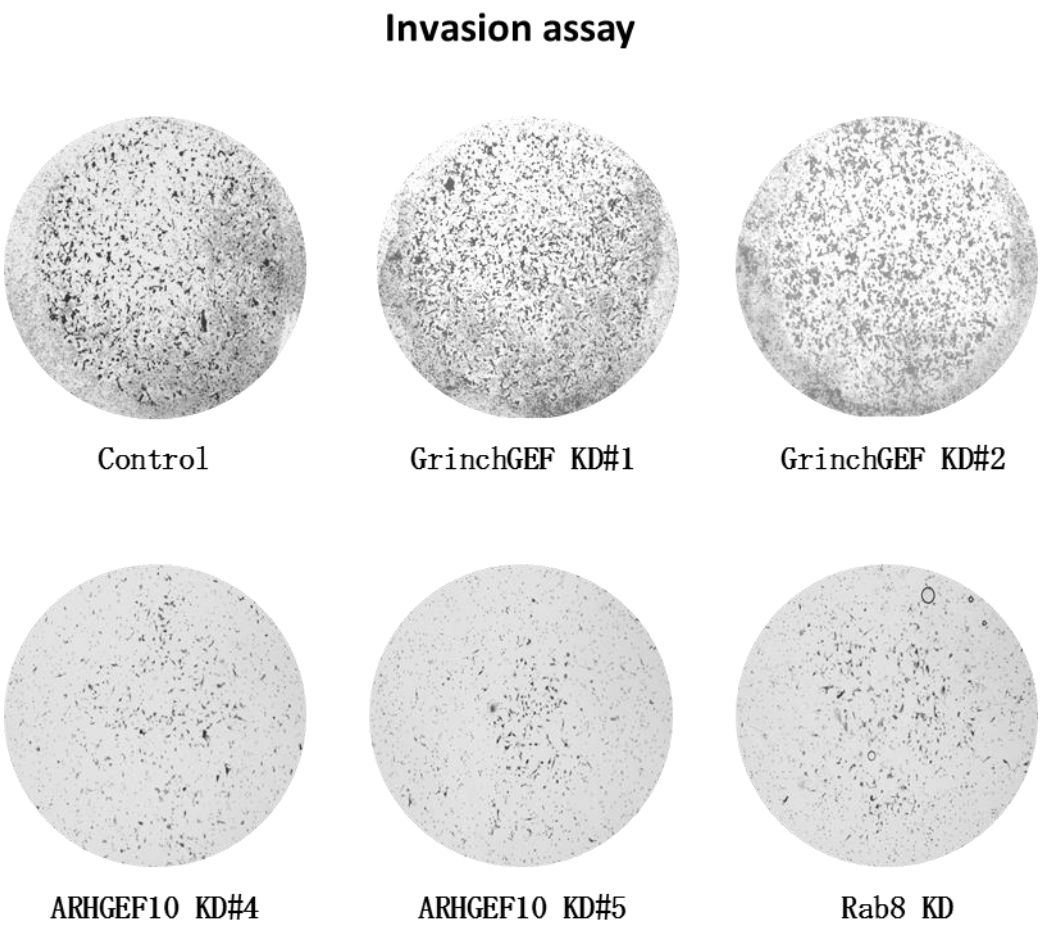


図 11　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの
細胞浸潤能試験結果におけるギムザ染色像

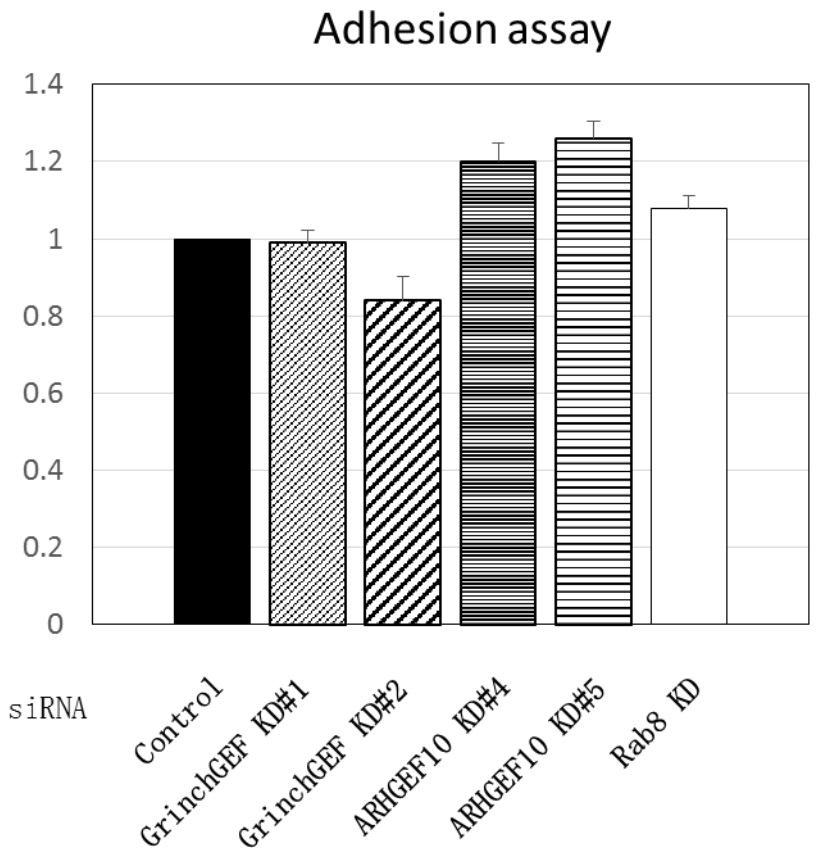
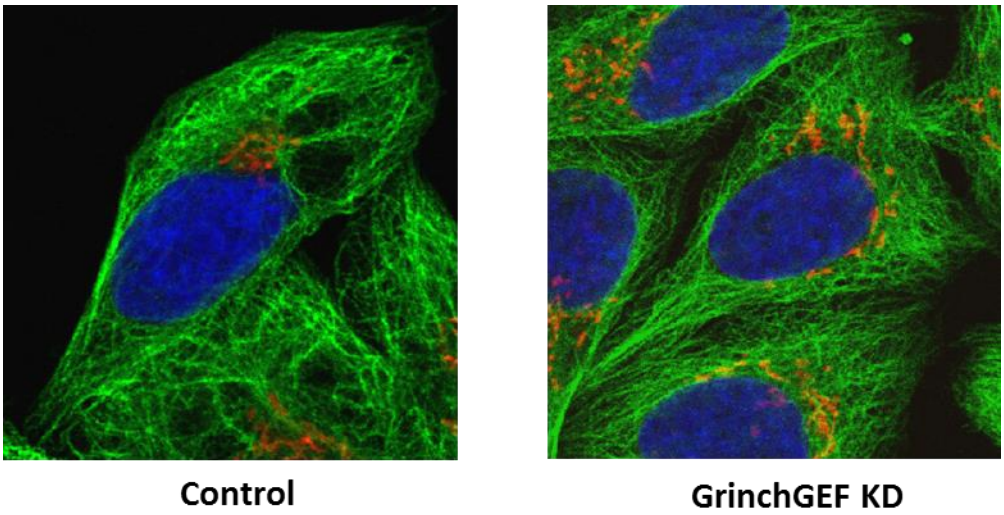


図 12　MDA-MB-231 細胞における各因子ノックダウンの
細胞接着能試験結果

A



B

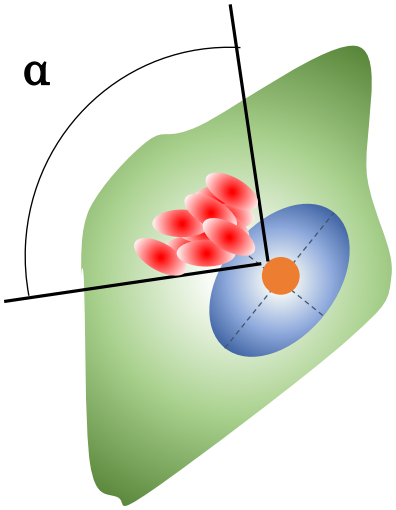
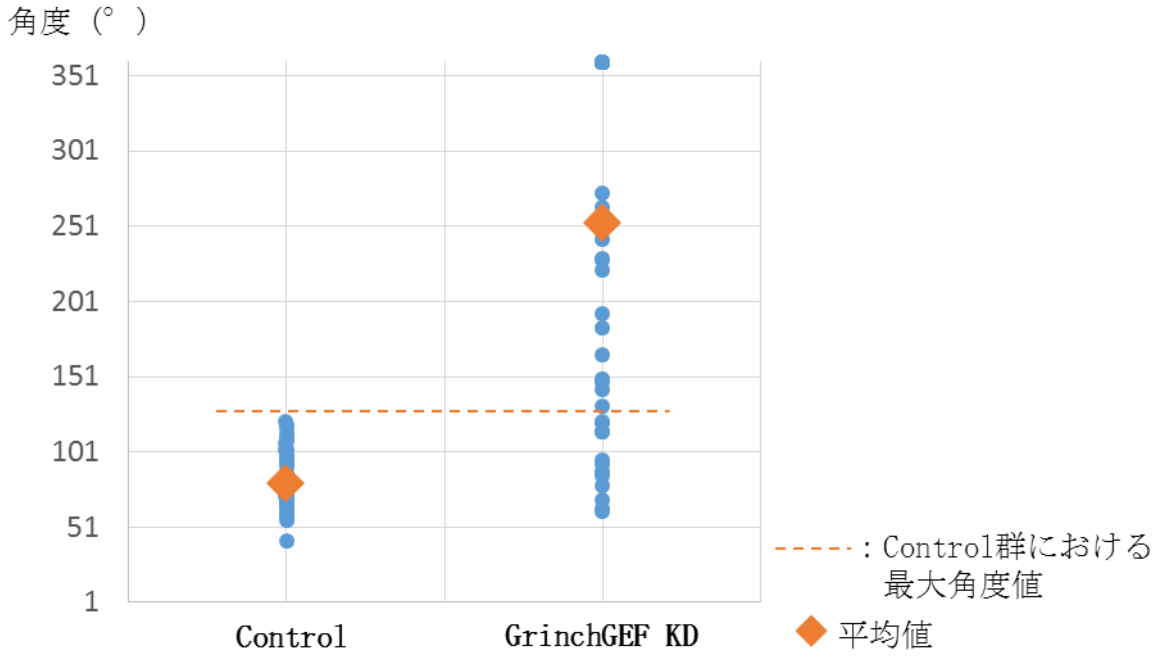


図 13　　HeLa 細胞におけるゴルジ体の配置
緑：微小管、赤：ゴルジ体、青：核

A



B

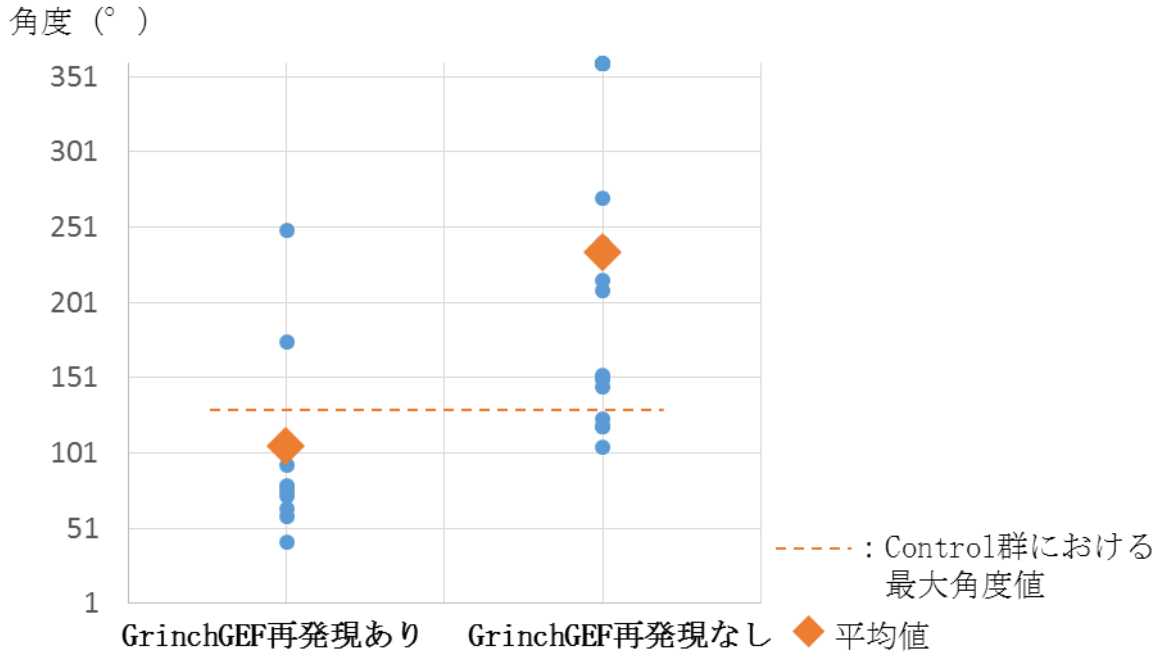


図 14　HeLa 細胞におけるゴルジ体配置の角度計測結果

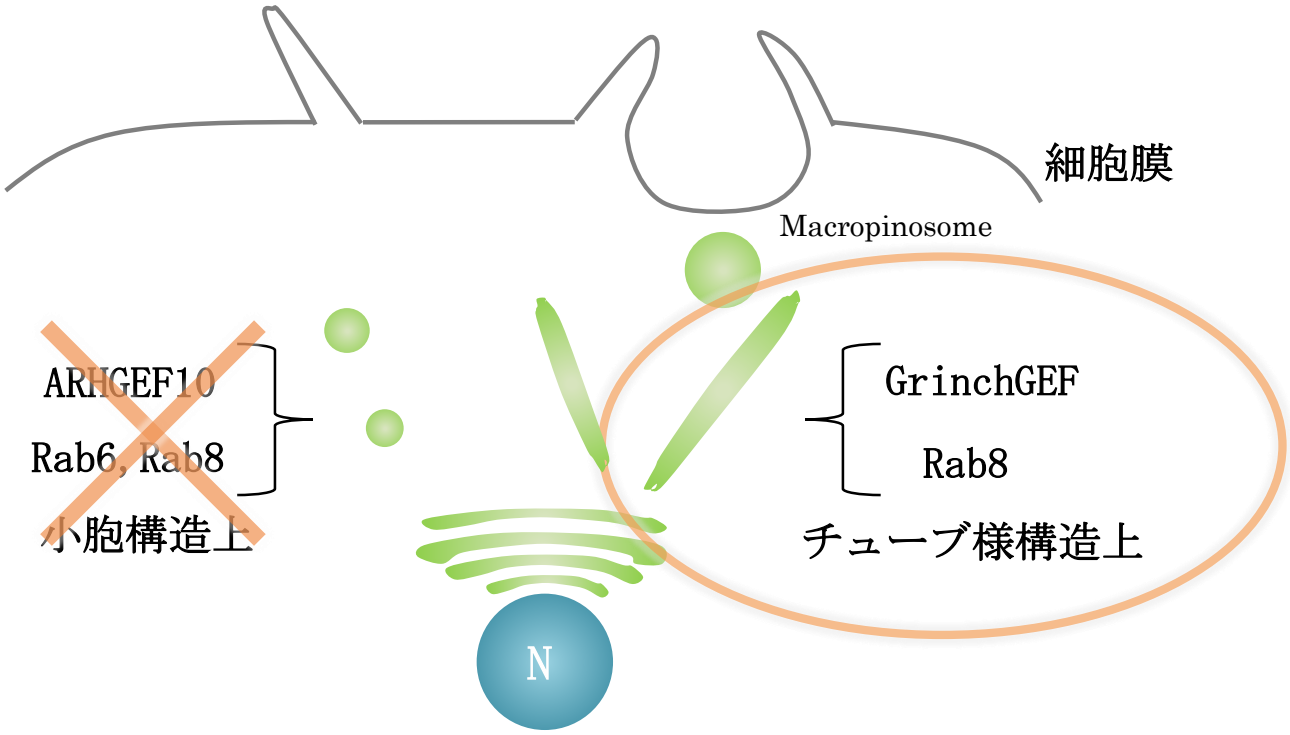


図 15　GrinchGEF の細胞内局在および輸送経路（模式図）