

# 博士論文

## 慢性骨髄性白血病の病原因子である p210 BCR-ABL の PH ドメインに関する病理的機能解析

同志社大学大学院 生命医科学研究科 医生命システム専攻

博士後期課程 分子生命化学研究室

4E152002

島崎 健太郎

指導教員 西川 喜代孝 教授

## 目次

1. 序論	1
2. p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性解析	
1. 概要	6
2. 実験方法	8
3. 結果	12
4. 考察	14
5. 結論	16
6. 図表	17
3. p210 BCR-ABL PH ドメインの病的機能解析	
1. 概要	23
2. 実験方法	26
3. 結果	29
4. 考察	33
5. 結論	37
6. 図表	38
4. 結語	49
5. 引用文献	50
6. 謝辞	

## 1. 序論

慢性骨髄性白血病 (CML: chronic myeloid leukemia) は造血幹細胞の腫瘍化を起点とした白血球の異常増殖を主症状とする骨髄増殖性疾患である<sup>1</sup>。CMLは、9番染色体と22番染色体の相互転座により生じる融合染色体、フィラデルフィア染色体を有するという特徴がある。相互転座の結果、22番染色体上の *bcr* 遺伝子と9番染色体上の *abl* 遺伝子の融合が生じる。その融合遺伝子産物である BCR-ABL タンパク質には *bcr* 遺伝子の転座部位の違いにより、p190、p210、p230 といった複数のバリエントが存在する (図1)。これらの内、CMLで最も頻繁にみられる p210 BCR-ABL は、およそ90%以上のCML患者においてその発現が認められていることからCMLのドライバー因子であると考えられている<sup>2,3</sup>。その一方で、p190 BCR-ABL は急性リンパ性白血病に、p230 BCR-ABL は好中球に限定的なCMLの発症にそれぞれ関係することが知られている<sup>4,5</sup>。

ABL は非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞骨格のリモデリングによる細胞運動性の決定や細胞接着、さらには受容体のエンドサイトーシス制御、DNA 損傷に対する応答やアポトーシス等、様々な役割をもつことが知られており、その活性は厳密な制御を受けている<sup>6</sup>。しかしながら、BCR-ABL は BCR の CC ドメイン依存的に多量体化することで ABL 本来の活性制御機構から逸脱し、恒常的な活性を獲得する。そして BCR-ABL の下流シグナル経路である PI3K/AKT 経路、JAK/STAT 経路、RAS/MAPK 経路などが過剰に活性化されることで、CML 細胞の生存、増殖が促進される<sup>7</sup> (図2)。CML の治療薬として開発されたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs: tyrosine kinase inhibitors) であるイマチニブ、続く第2世代 TKIs であるニロチニブ、ダサチニブは CML 患者の治療成績を劇的に改善したが、キナーゼドメインの ATP 結合領域中の 315 番目のスレオニンがイソロイシンに置換した変異体 (Thr315Ile) が第1、第2世代 TKIs に対して耐性をもつことが報告されており<sup>7,8</sup>、その存在は臨床上大きな問題となっている。近年その使用が国内においても承認された第3世代 TKI であるポナチニブは Thr315Ile 変異体に対しても治療効果を示すが、キナーゼドメインに2箇所以上の点変異を有する変異体がポナチニブに対しても耐性を示すことが報告されていることから<sup>9</sup>、TKIs 耐性を克服したとは言い難い。また TKIs 断薬後の患者の多くで CML

の再発が認められていること<sup>10</sup>、CML 幹細胞は自身の生存、増殖にそのチロシンキナーゼ活性を必要としないこと<sup>11,12</sup>、が報告されている。以上のことから、キナーゼドメインとは異なる、p210 BCR-ABL の他の機能ドメインを標的とした治療薬の開発が望まれている。

現在までに判明している、p210 BCR-ABL のキナーゼドメインを除く各ドメインの CML における機能を表 1 に示す。これらのドメインは BCR に由来するドメイン (N 末端から CC: coiled coil, DH: Dbl homology, PH: pleckstrin homology) と、ABL に由来するドメイン (N 末端から SH(3/2): Src homology, FAB: F-actin binding) 、に大別される。CC ドメインを介し、BCR-ABL は多量体 (2 量体、あるいは 4 量体) 構造をとる。本機構は BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性の獲得、それに続く CML の発症に必須であると考えられている<sup>13,14</sup>。DH ドメインは RhoA 特異的な GEF (Guanine nucleotide exchange factor) 活性を有し、CML 細胞の運動性に寄与する<sup>15,16</sup>。さらに近年、本ドメインの下流因子である ROCK の活性化が CML 細胞の自然免疫回避に働くことが示されている<sup>17</sup>。PH ドメインは各種リン脂質の内、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P、PtdIns(5)P を認識することが示されているが<sup>18</sup>、CML の病態への関与は不明である。SH3 ドメインは ABL においてはチロシンキナーゼ活性の抑制性自己制御領域として機能するが、CC ドメイン依存的に活性化した BCR-ABL においては十分に機能していないと考えられている<sup>19</sup>。SH2 ドメインもまた ABL チロシンキナーゼ自己制御領域として機能するが、SH3 ドメインとは異なり、SH2 ドメインによるチロシンキナーゼ活性制御機構は BCR-ABL の活性化、それに続く CML の発症においても重要な役割を果たしていることが判明している<sup>20,21</sup>。FAB ドメインは F-actin 結合活性を有する領域であり、BCR-ABL を細胞骨格へと繋ぎ止めることでその細胞内局在性を決定している<sup>22</sup>。FAB ドメインの結合変異導入によって F-actin 依存的な局在性が変化し、その結果 BCR-ABL のがん化誘導能が低下することから<sup>23,24</sup>、CML の発症に関与していると考えられている。そこで本研究では、これらドメインのうち病理的機能の不明である PH ドメインに着目した。

PH ドメインは現在細胞内に 250 種類以上のタンパク質において存在しホスホイノシタイドや酸性リン脂質と相互作用することで、細胞内情報伝達機構において重要な役割を果たしている<sup>25,26</sup>。代表的な PH ドメインとそのリガンドの結合の構造情報を図

3に示した。一部例外はあるものの、PHドメインはN末端から7本の $\beta$ ストランドにより形成される逆平行の2枚の $\beta$ シート構造を、C末端には $\alpha$ ヘリックスを1つもつという構造をとる。各ストランド間に形成されるループ構造のうち、 $\beta$ 1- $\beta$ 2ループにより形成されるポケットにリガンドであるリン脂質が結合する。リガンドが判明しているPHドメインの内、多くはホスホイノシタイドと、あるいはその一部は酸性リン脂質の中のリン酸基と、それぞれ静電的に相互作用することで、そのリン脂質結合活性を発揮している<sup>27-29</sup>。p210型BCR-ABLのPHドメインは、PtdIns(3)PやPtdIns(4)P、PtdIns(5)Pといったモノホスホイノシタイドを認識しうることが報告されている<sup>18</sup>。しかしながらこの知見は、シート上に各種100%の割合でスポットされたリン脂質に対する結合特性を調べたものであるうえに、そのリガンド特性がCML病態にもたらす影響に関しては依然として明らかにされていない。そこで本研究では、リン脂質小胞を用いることでリガンドの存在状態を生理的条件に近い状態に再構成し、1) p210型BCR-ABL PHドメインのリガンド特性を解析すること、2) そのリガンド特性を基盤とし、p210型BCR-ABL PHドメインの病的機能を解明すること、を目的とした。

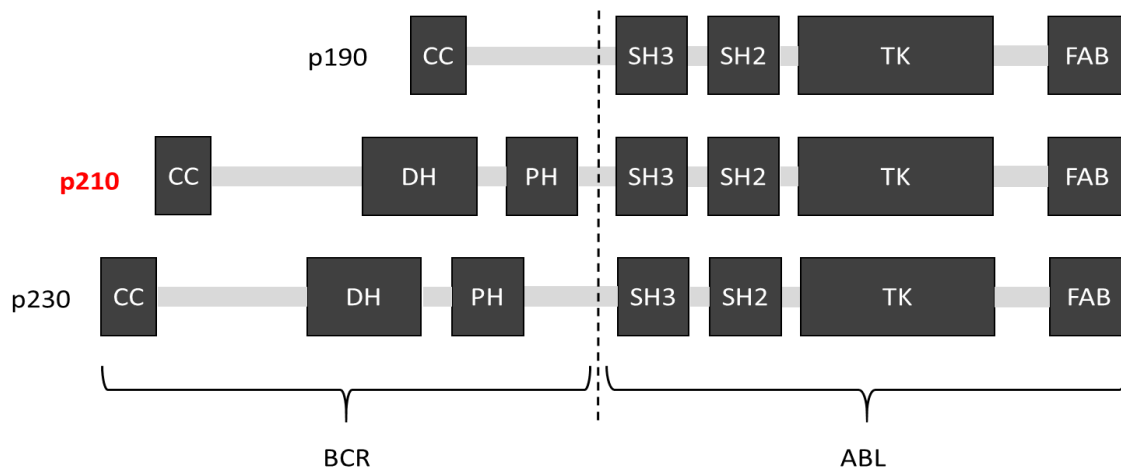


図 1. BCR-ABL の各バリエーションのドメイン構造

破線は BCR と ABL の融合境界部を示している。破線より左側が BCR 由来の、右側が ABL 由来のドメインである。CC: coiled coil、DH: dbl homology、PH: pleckstrin homology、SH: src homology、TK: tyrosine kinase、FAB: F-actin binding

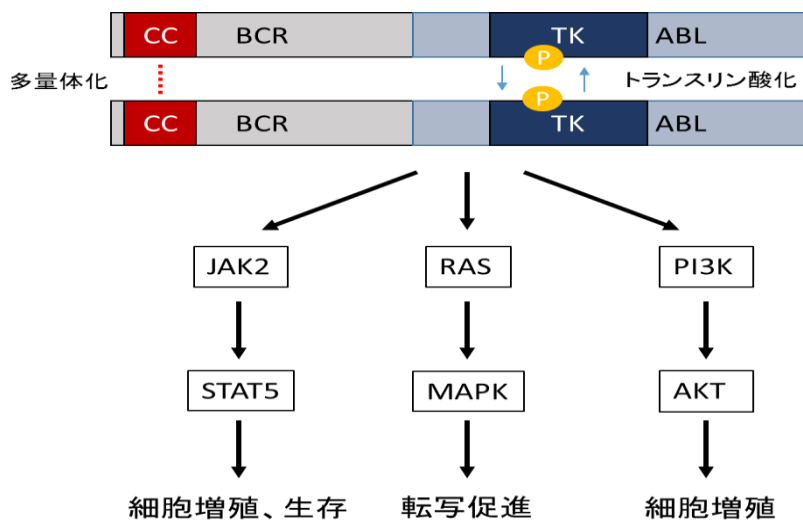
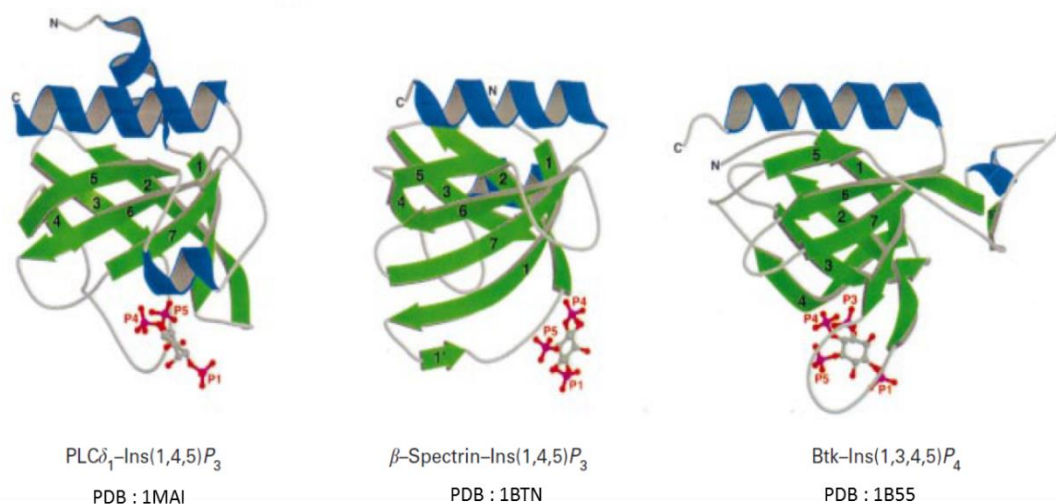


図 2. p210 BCR-ABL の活性化による下流シグナル経路概略

BCR 由来の CC ドメイン依存的に多量体構造を形成した結果、ABL のチロシンキナーゼ領域がお互いに近接することによってトランスリン酸化が生じ、活性を獲得する。CC ドメインによる多量体化は不可逆的であるため、BCR-ABL チロシンキナーゼは恒常的に活性化し、下流シグナルを過剰に促進させがん化をもたらす。

表 1. p210 BCR-ABL のチロシンキナーゼドメイン以外の各ドメインの病的機能

ドメイン	CML における機能
CC	BCR-ABL の多量体化を担い、チロシンキナーゼ活性化に必須。
DH	CML 細胞の運動性を決定。下流因子の活性化により CML 細胞の自然免疫回避にも働く。
PH	モノホスホイノシタイドを認識するとされているが、その機能は不明。
SH3	本来ならば ABL チロシンキナーゼの自己活性抑制領域として機能するが、CC ドメイン依存的な活性化により十分に機能していない。
SH2	ABL と同様に、BCR-ABL においてもチロシンキナーゼの自己活性化領域として機能する。
FAB	BCR-ABL の F-actin への結合を担う。CML 発症に役割をもつとされている。



Biochem. J., (2000), 350, 1-18 より改変

図 3. 各 PH ドメインとそのリガンドの立体構造

代表的な PH ドメイン (左から PLC $\delta$ 、Spectrin、Btk) と各リガンドリン脂質頭部 (左から Ins(1,4,5)P $_3$ 、Ins(1,4,5)P $_3$ 、Ins(1,3,4,5)P $_4$ ) との相互作用を示した。

## 2. p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性解析

### 2-1. 概要

PH ドメインはリガンドであるホスホイノシタイドや酸性リン脂質と結合することで、細胞内情報伝達機構において重要な役割を担う領域である。 p210 BCR-ABL PH ドメインはモノホスホイノシタイドに結合活性を示すとされているが、それは 100%の割合でシート上にスポットされたリン脂質に対する結合であり、脂質本来の生理的存在状態からはかけ離れた実験系から得られた知見である。 さらに、その CML における病理的な役割は全く明らかになっていない。 そこで私は、各リガンド候補リン脂質を脂質小胞上に構成させ、より生理的な存在状態に近い環境でのリガンド特性を解析することにより、PH ドメインの機能に関して信頼性の高い知見を得ることが可能になると考えた。

pET 発現系により発現させた 6 x His タグ融合 p210 BCR-ABL PH ドメインを Ni<sup>2+</sup> ビーズを用いたアフィニティー精製により回収し解析に用いた。 脂質小胞を用いたリガンド特性解析の実験系の確立を、PtdIns(4)P を特異的に認識することが知られているセラミド輸送タンパク質である CERT (Ceramide transport protein) の PH ドメインをポジティブコントロールとして用いて行った。 その結果、p210 BCR-ABL PH ドメインは報告されていたモノホスホイノシタイドではなく、カルジオリピン (CL: cardiolipin) に最も強く、次いで PA (phosphatidic acid)、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>に結合することを見出した。 更なる解析の結果、p210 BCR-ABL PH ドメインは脂質小胞内の CL 密度に強く依存した結合様式をとることが明らかとなった。

続いて、これらリガンドとの相互作用に関わるアミノ酸部位を特定するため、リガンド既知の PH ドメインとのアラインメント解析を行った。 その結果、BCR PH ドメインの 711 番目のリシン、723 番目のアルギニン、724 番目のリシンおよび 726 番目のアルギニンがリガンド認識に関わると推測された。 これらのアミノ酸残基のリガンド認識への寄与を検証するため、4 つのアラニン置換変異体 (K711A, R723A, K724A, R726A) を新たに作製し、CL、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>含有小胞を用いて解析を行った。 その結果、いずれの変異体においても野生型と比較し結合活性の減少が認め



られたが、特に R726A において顕著な減少がみられた。即ち、R726 が p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識において主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1. BCR PH ドメイン発現コンストラクトの作製、および部位特異的変異の導入

表 2 のプライマーを用いて FLAG タグ融合 p210 BCR-ABL 発現コンストラクト（東京女子医科大学 丸 義朗 教授および塚原 富士子 講師からの恵与）を鋳型に PCR を行い、*NheI*-*Bam*HI サイトに導入可能な DNA 断片を得た。この DNA 断片を pET28b(+)-ベクター (Novagen) の前述したサイトへとライゲーションし、N 末端に 6 x His タグが融合した BCR PH ドメインの発現コンストラクトを得た。

表 3 のプライマーを用いて上記 6 x His タグ融合 BCR PH ドメイン発現コンストラクトを鋳型に PCR を行い、各アラニン置換変異体を作製した。複製された変異 DNA 鎖を *DpnI* (TOYOBO) で処理しメチル化 DNA 鎖 (テンプレート) およびヘミメチル化 DNA 鎖 (テンプレート&変異鎖) を消化し、変異導入二重鎖を得た。変異導入はシーケンス解析にて確認した。

### 2-2-2. リコンビナントタンパク質の精製

コンピテントセル BL21 ( $\lambda$ DE3) 株を 2-2-1 項より取得した 6 x His タグ融合 BCR PH ドメイン発現コンストラクト、および 6 x His タグ融合 CERT PH ドメイン発現コンストラクト (国立感染症研究所 花田 賢太郎 博士および熊谷 圭吾 博士からの恵与) により形質転換した。前培養した大腸菌を、BCR PH ドメイン発現体は 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyanoside) (Wako) を加え 15°C で 18 時間、CERT PH ドメイン発現体は 250  $\mu$ M IPTG を加え 25°C で 16 時間培養し、各リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。遠心操作により回収した大腸菌を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含有した溶解バッファー (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 50 mM フッ化ナトリウム, 270 mM スクロース, 2.5 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mg/ml ポリミキシン B, 1% Triton X-100) により懸濁、超音波処理を行い細胞懸濁液を得た。遠心操作後、生じた上清画分を回収し Ni<sup>2+</sup>-charged His-Bind resin (Novagen) を加え 4°C で一晩反応させた。反応終了後、洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 500 mM 塩化ナトリウム, 60 mM イミダゾール) にて十分な洗い操作を行い、溶出バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 300 mM 塩化ナトリウム, 200 mM イミダゾール) によりビーズ上の BCR PH ドメインおよび CERT PH ド

メインを溶出、可溶化精製標品を取得した。

### 2-2-3. SDS-PAGE

アクリルアミド濃度 3.8%の濃縮ゲル、アクリルアミド濃度 16%の分離ゲルを用い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

### 2-2-4. BCA 法によるタンパク質の定量

精製したリコンビナントタンパク質の濃度を測定するために、BCA Protein Assay Reagent (Thermo) を使用した。吸光度計を用いて波長 570 nm で比色定量を行い、作成した検量線を基にして最終精製標品のタンパク質濃度を算出した。

### 2-2-5. 脂質小胞の調整

本実験により用いた脂質は以下のメーカーから購入した。Egg PC (phosphatidylcholine) (Wako)、PI (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol)) (Sigma)、PtdIns(3)P (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-3'-phosphate)) (Cayman)、PtdIns(4)P (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-4'-phosphate)) (Sigma)、PtdIns(5)P (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-5'-phosphate)) (Cayman)、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-3',4'-diphosphate)) (Cayman)、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-4',5'-diphosphate)) (Cayman)、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol-3',4',5'-triphosphate)) (Cayman)、PS (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine) (Avanti)、PG (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)) (Avanti)、biotin-PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(biotinyl)) (Avanti)。

CLはウシの心臓より精製したものを使用した<sup>30</sup>。

各脂質が溶解した有機溶媒 (クロロホルム:メタノール=2:1) をそれぞれガラス管に添加し混合後、窒素ガス噴射により溶媒を揮発させ脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムに TBS (Tris-buffered saline; 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM 塩化ナトリウム) を加えボルテックスを行い水和させた。生じた多層小胞溶液に液体窒素による

凍結融解操作を 5 回繰り返す、超音波処理にかけることで単層小胞溶液を取得、これを実験に用いた。

#### 2-2-6. 固相化タンパク質と脂質小胞上リガンドの結合活性測定

固相化タンパク質と脂質小胞上リガンドの結合活性の検出には、小胞上のビオチン化 PE 上のビオチンとストレプトアビジンの相互作用を利用した。96 穴プレート (Greiner) に各タンパク質 (BCR PH ドメインおよびその変異体: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CERT PH ドメイン: 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in TBS) を 4°C で一晩静置させることで、プレート上に固相化させた。TBS に希釈した 3% ウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) (Sigma) を各ウェルに添加し室温で 2 時間静置しブロッキングを行った後、1% BSA-TBS 中に希釈したビオチン化 PE をモル比 5% で含む脂質小胞 (脂質小胞の組成は図のレジェンドに示す) を加え、固相化タンパク質と室温で 1 時間反応させた。TBS による洗浄後、1% BSA-TBS に希釈した HRP 融合ストレプトアビジン (1:5000) を添加し室温で 1 時間反応させた。TBS による洗浄後、 $\sigma$ -フェニルメチレンジアミンを基質とした発色反応を 15-30 分間行い、発色強度を吸光度計により測定した。

表 2. 6 x His タグ融合 p210 BCR-ABL PH ドメイン発現コンストラクト作製に用いたプライマー配列

Forward	5'-AGAGGCTAGCCGGCAGCTGCTGAAGGACAGCTTC-3'
Reverse	5'-AGAGGGATCCTCAACACTTCTTCTGCTGCTC-3'

表 3. p210 BCR-ABL PH ドメイン点変異導入に用いたプライマー配列

K711A	Forward	5'-CGGCAGCTGCTGGCCGACAGCTTCATG-3'
	Reverse	5'-CATGAAGCTGTCGGCCAGCAGCTGCCG-3'
R723A	Forward	5'-GTGGAGGGGGCCGCCAAGCTGCGCCAC-3'
	Reverse	5'-GTGGCGCAGCTTGGCGGCCCCCTCCAC-3'
K724A	Forward	5'-GAGGGGGCCCGCGCCCTGCGCCACGTC-3'
	Reverse	5'-GACGTGGCGCAGGGCGCGGGCCCCCTC-3'
R726A	Forward	5'-GCCCCGAAGCTGGCCCACGTCTTCCTG-3'
	Reverse	5'-CAGGAAGACGTGGGCCAGCTTGCGGGC-3'

## 2-3. 結果

### 2-3-1. p210 BCR-ABL PH ドメインは CL 含有脂質小胞を効率的に認識する

BCR PH ドメインのリガンド特性を解析する実験系の確立に際して、初めに pET 発現系による BCR PH ドメイン、およびポジティブコントロールとしての CERT PH ドメインの精製を行った。その結果、1 L の培養スケールで可溶化精製標品が、BCR PH ドメインで 200-300  $\mu\text{g}$ 、CERT PH ドメインが 1-2 mg の収量で得られた (図 4 A,B)。

Miroshnychenko らは 2010 年に、各種リン脂質がそれぞれスポットされたニトロセルロース膜 (リン脂質 strips) を用い、BCR PH ドメインが PtdIns(3)P や PtdIns(4)P、PtdIns(5)P といったモノホスホイノシタイドを認識しうることを報告している。本論文において我々は、プレート上に固相化したタンパク質と各種リン脂質を含有した脂質小胞との結合を検出する実験系を確立、運用することで、より生理的な条件に近い状態でのリガンド特性を解析できると考えた。まずは、ポジティブコントロールとしてセラミド輸送タンパク質である CERT PH ドメインを用いた。CERT PH ドメインは、リン脂質 strips を用いた解析で PtdIns(4)P を認識することが、また脂質小胞共沈法による解析で PtdIns(4)P と PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を認識することが、それぞれ示されている<sup>31,32</sup>。小胞体にてセラミドと結合した CERT が、PH ドメインを介してトランスゴルジ体に局在する PtdIns(4)P へと結合することで、ゴルジ体へのセラミドの運搬が可能となることが明瞭に示されていることから (図 5 A)、CERT PH ドメインによる PtdIns(4)P の特異的認識の生理的な意義は十分に確立されている。本実験系の概略を図 5 B に示した。まず、CERT PH ドメインのリガンド特性を評価したところ、PtdIns(4)P、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> に顕著な結合が認められた (図 5 C)。これらのリン脂質は全てイノシトール環の 4 位にリン酸基を有している。さらに本実験系においても PtdIns(3)P や PtdIns(5)P に対する結合は認められなかった。これは先行研究の結果と一致するものである<sup>31-33</sup>。以上の結果より、本実験系において PH ドメインのリガンド選択性の精確な評価が可能であると判断し、p210 BCR-ABL PH ドメインの解析を行った。驚くべきことに、p210 BCR-ABL PH ドメインは既存の報告にあったモノホスホイノシタイドではなく、CL に最も強く、次いで PA、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> に結合した (図 5 D)。続いて、p210 BCR-ABL PH ドメインの CL、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の認識に対する脂質小胞濃度依存性について検討し、各々

のリン脂質の解離定数 ( $K_d$  値) を算出した (図 5 E)。さらに脂質小胞内のリガンド濃度依存性についても検討したところ、いずれのリガンドにおいてもその濃度増加に伴う結合活性の増加が認められた。しかしながら、 $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  と  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  に比べ、CL においてはその濃度が 20%以上の点で顕著な結合活性の増加がみられた (図 5 F)。以上の結果から、p210 BCR-ABL PH ドメインは CL に対して、その結合親和性は  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  や  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  よりも低いものの、CL 濃度がある一定の閾値を超えると非常に強力に結合するというユニークなリガンド結合様式をもつことが明らかとなった。

### 2-3-2. p210 BCR-ABL PH ドメインの脂質リガンド認識部位の同定

一般的に、PH ドメインのリガンド脂質の認識は  $\beta 1$ - $\beta 2$  ループ中のコンセンサス配列である  $\text{K-X}_n\text{-(K/R)-X-R}$  領域を介するとされている。本配列中のリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸と、イノシトールリン脂質等のリン酸基との間に形成される静電的な相互作用がリガンド認識に重要な役割を果たすことが示されている<sup>25,34</sup>。そこで私は、p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識部位を同定するために、上記コンセンサス配列の探索を行ったところ、711 番目のリジン (K711) から 726 番目のアルギニン (R726) において保存されていることが明らかとなった (図 6 C)。本領域中には K711、R723、K724、R726 の 4 つの塩基性アミノ酸が存在していた。これら塩基性アミノ酸のリガンド認識への寄与を明らかにするために、p210 BCR-ABL PH ドメインの上記 4 箇所のアラニン置換変異体 (K711A, R723A, K724A, R726A) を作製し、CL、 $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ 、 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  含有小胞に対するそれぞれの結合活性への影響を検討した (図 6 A)。その結果、いずれの変異体においても各リガンドに対する結合活性の減少を認めた。このうち R726A に最も大きな結合活性の減少が認められた (図 6 B)。以上の結果から、p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識には、R726 部位が重要な役割を担うことが明らかとなった。

## 2-4. 考察

本研究では、p210 BCR-ABL PH ドメインが、CL や PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> といったリン脂質を認識すること、特に CL においてはその密度に強く依存した結合様式をもつことを明らかにした。さらに、そのリガンド認識に R726 が重要であることも明らかにした。

現在までに判明している PH ドメインを有している 250 種類以上のタンパク質のうち、CL に結合することが報告されているものは、ミトコンドリア近傍で RNA 顆粒と複合体を形成することが知られている CLPABP (CL and phosphatidic acid-binding protein) のみである<sup>35</sup>。CLPABP は分子内に 2 つの PH ドメインを有し、そのどちらも CL を認識するとされている。しかしながら、CLPABP PH ドメインにはコンセンサス配列に相当する領域は存在せず、そのリガンド認識に関与する部位も明らかになっていない。その一方で、CL を認識することが既に判明している Drp1 や LC3、tBid といったタンパク質は PH ドメインを保持していない<sup>36-38</sup>。Drp1 はミトコンドリア分裂を司るタンパク質であり、B インサートと呼ばれる領域のループ構造中に存在する 4 つのリシン (K557, K560, K569, K571) により形成される塩基性アミノ酸クラスターが、CL との相互作用に関与することが判明している<sup>36</sup>。LC3 はオートファジー関連タンパク質であり、 $\alpha$  ヘリックス中の 2 つのアルギニン (R10, R11) により形成されるパッチ構造が、CL の認識に重要な役割を果たしている<sup>37</sup>。tBid はアポトーシス実行に働くタンパク質であり、 $\alpha$  ヘリックス中の 2 つのリシン (K157, K158) を介して CL と相互作用することが判明している<sup>38</sup>。以上を踏まえると、近接した塩基性アミノ酸のクラスターが CL との相互作用に重要であると推察される。一方で、CLPABP の 2 つの PH ドメインどちらにおいても、その 1 次構造中に塩基性アミノ酸クラスターが認められることから同様の相互作用が働いている可能性があるが、いまだに CL との結合に関わるアミノ酸は同定されておらず推定の域をでない。本研究では、p210 BCR-ABL PH ドメインが CL を特異的に認識すること、さらにその認識にはコンセンサス配列に保存されている R726 が重要であることを明らかにした。これは、PH ドメインと CL の相互作用に関する分子機構を解明したはじめての例である。

これまでに明らかにされている重要な知見として、全 PH ドメインのうち、およそ 10% がホスホイノシタイドを特異的に認識すること、さらにこの場合のリガンドは



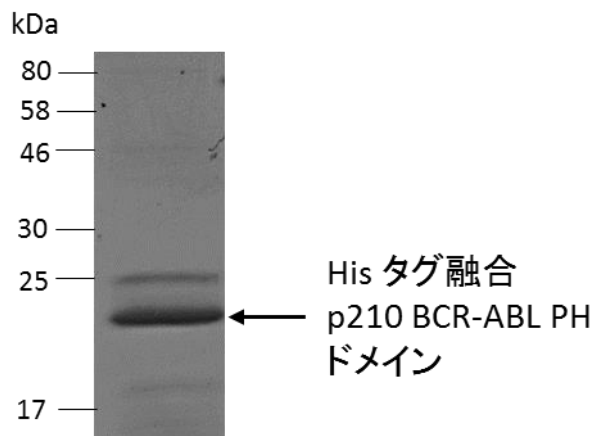
PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> や PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> のような隣接した 2 つのリン酸基を有する分子種に限られること、が明らかにされている<sup>26</sup>。CL は PG が 2 分子重合した構造から成り、グリセロール骨格を介して 2 つのリン酸基を分子内に有している。以上のことから、p210 BCR-ABL PH ドメインは、PLC $\delta$  や AKT といったシグナル分子の PH ドメインと同様に、隣接した 2 つのリン酸基構造を特異的に認識する特徴的なグループに分類されると考えられる<sup>39,40</sup>。これまでに明らかになっている PLC $\delta$  と AKT の Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> に対する相互作用解析から、2 つのリン酸基を認識するタンパクのリガンド認識には、コンセンサス配列 K-X<sub>n</sub>-(K/R)-X-R のうち先頭のリシンおよび末尾のアルギニンと、リン酸基との水素結合形成が重要であることが立体構造情報から明らかになっている<sup>34,41,42</sup>。本研究において、p210 BCR-ABL の PH ドメインのリガンド認識に重要な役割を果たすことが判明した R726 はコンセンサス配列の末尾のアルギニンに相当していることから (図 6 C)、PLC $\delta$  や AKT の PH ドメインによるリガンド認識と同様の相互作用が発揮されている可能性が高い。

## 2-5. 結論

本研究から、p210 BCR-ABL PH ドメインは CL、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> をリガンドとして認識することが明らかにした。さらにそのリガンド認識には、PH ドメインのコンセンサス配列内の K711、R723、K724、R726 の塩基性アミノ酸が関与すること、特に R726 が最も重要な役割を果たすことを示した。

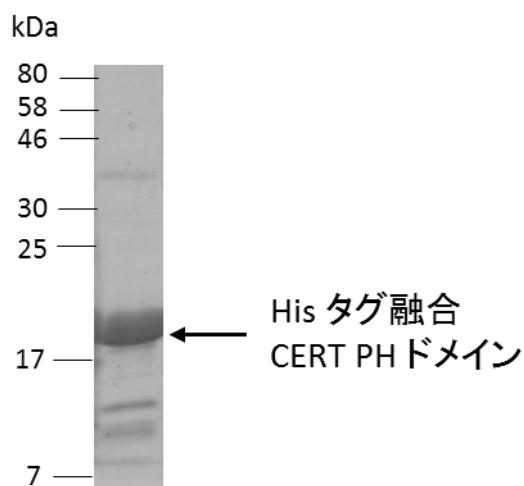
## 2-6. 図表

A.



同志社大学修士論文（島崎、2015）より引用

B.

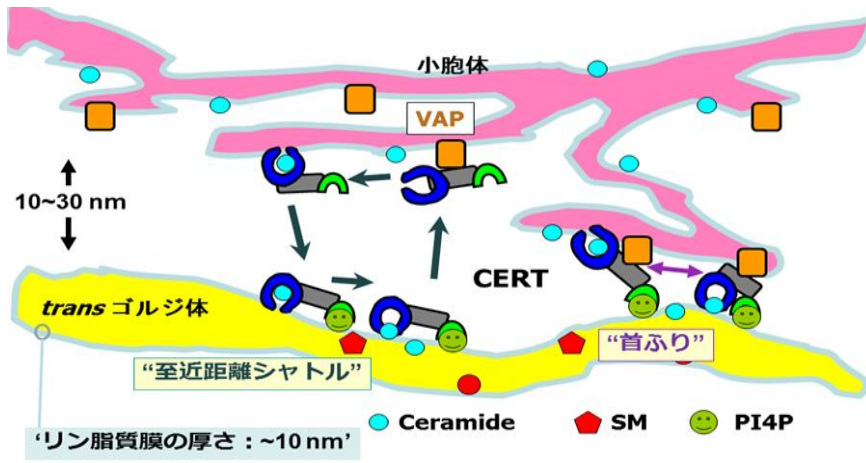


同志社大学修士論文（島崎、2015）より引用

### 図 4. 各リコンビナントタンパク質の精製

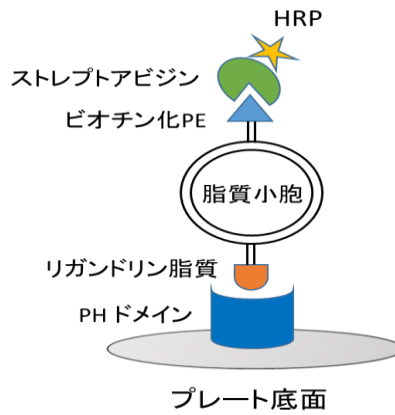
pET 発現系により各リコンビナントタンパク質 (A: p210 BCR-ABL PH ドメイン, B: CERT PH ドメイン) の発現を誘導し、His タグと  $\text{Ni}^{2+}$  ビーズによるアフィニティークロマトグラフィー精製を行い、最終精製標品を CBB 染色により確認した。

A.

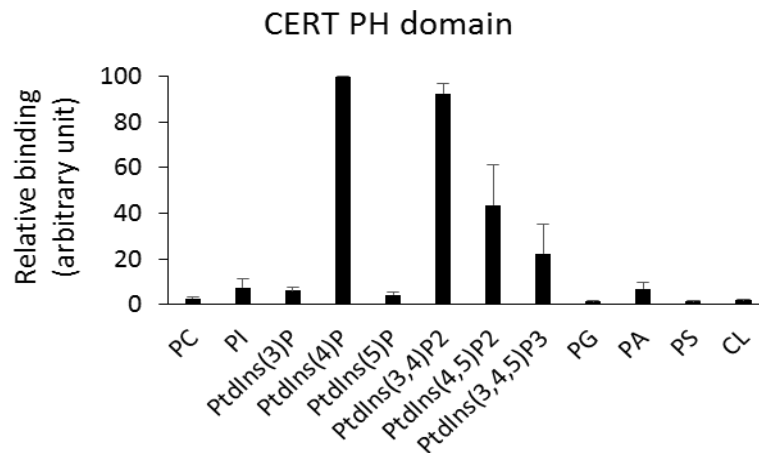


国立感染症研究所 細胞化学部 HP より引用

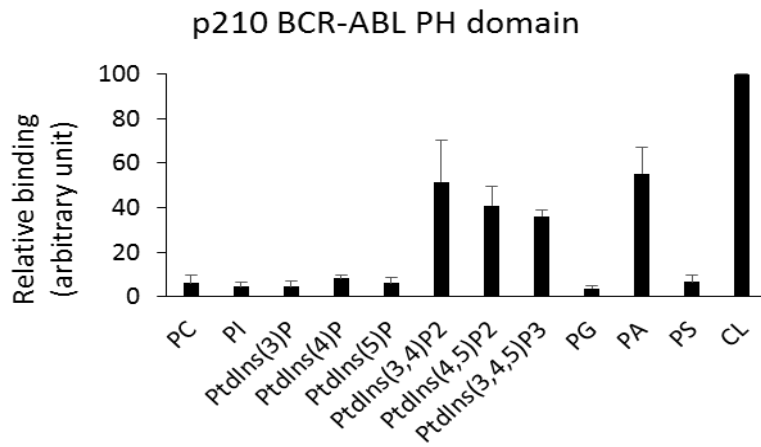
B.



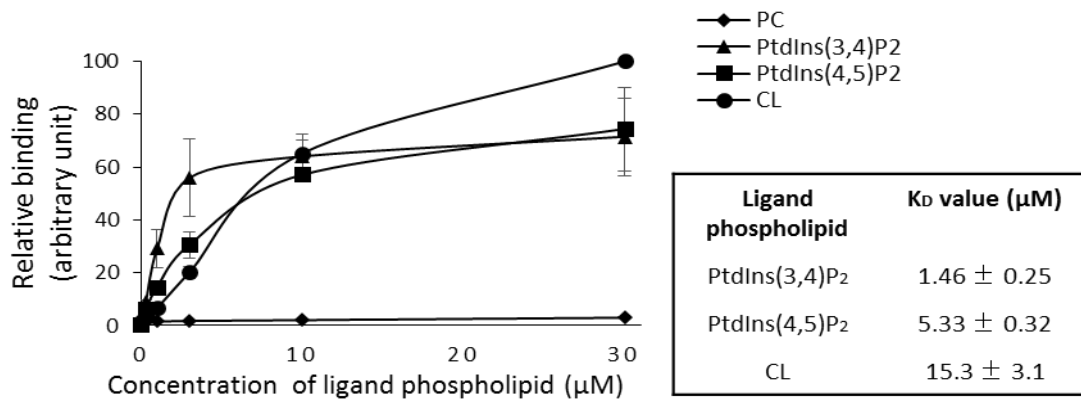
C.



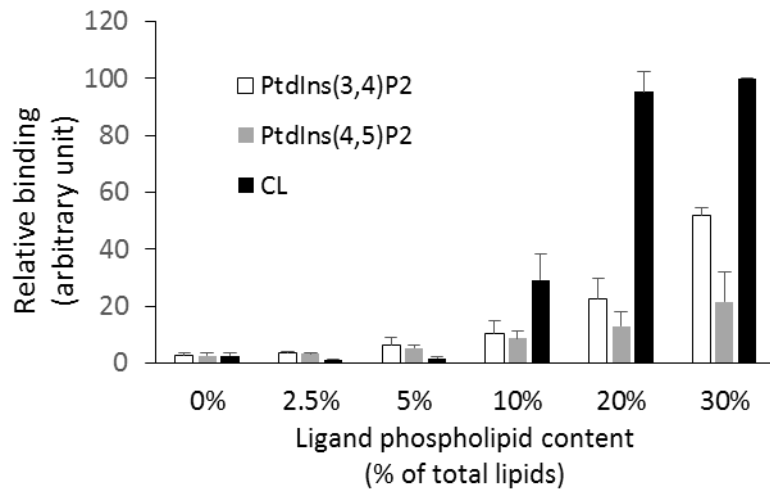
D.



E.



F.



## 図 5. p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性の解析

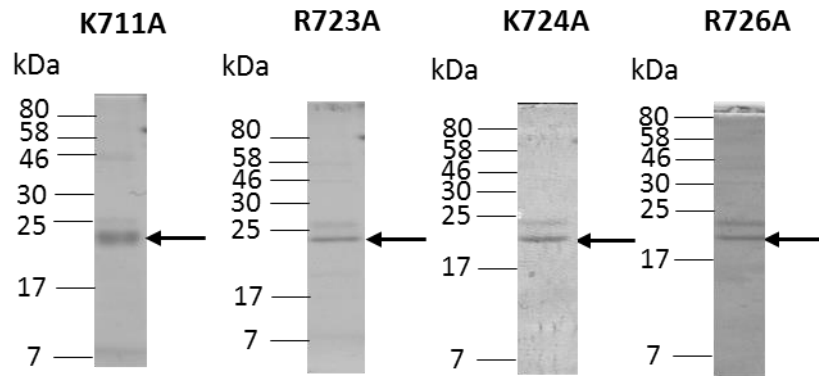
(A) セラミド輸送タンパク質である CERT は、スフィンゴリエリン (SM) の前駆体であるセラミドを小胞体からトランスゴルジ体へと運搬する。VAP タンパク質を介して小胞体に局在化した CERT はセラミドと結合する。PH ドメインとトランスゴルジ体上の PtdIns(4)P の相互作用によりもたらされる CERT のゴルジ体への局在化は、そのセラミド輸送機能に必須である。

(B, C, D) 本実験系の概略図を示した (B)。タンパク質と脂質小胞の結合検出には、脂質小胞中のビオチン化 PE のビオチンとストレプトアビジンの相互作用を用いた。脂質固相化させた CERT PH ドメイン (C)、および p210 BCR-ABL PH ドメイン (D) の、各リン脂質含有小胞 (構成脂質モル比. PC : 各リン脂質 : ビオチン化 PE = 85 : 10 : 5) に対する結合を評価した。脂質小胞は 100  $\mu$ M の濃度のものを用いた。なお、個々の実験データは最大結合値を 100 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している。

(E) 固相化させた p210 BCR-ABL PH ドメインの、各リン脂質含有小胞 (構成脂質モル比. PC : 各リン脂質 : ビオチン化 PE = 85 : 10 : 5) に対する結合を、複数濃度の脂質小胞を用いて評価した。右下の表は、結合曲線より算出されたリガンドリン脂質の解離定数 ( $K_d$  値) を示している。なお、個々の実験データは最大結合値を 100 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している。

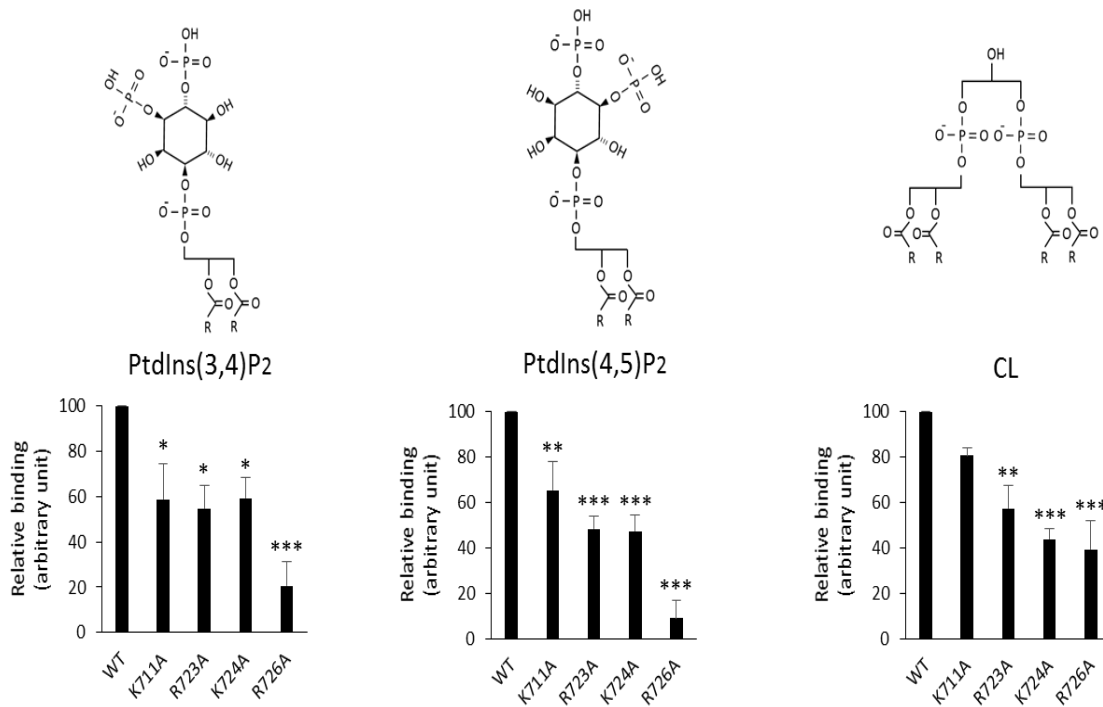
(F) 固相化させた p210 BCR-ABL PH ドメインの、各リン脂質含有小胞 (構成脂質モル比. PC : 各リン脂質 : ビオチン化 PE = 95 : 0 : 5, 92.5 : 2.5 : 5, 90 : 5 : 5, 85 : 10 : 5, 75 : 20 : 5, 65 : 30 : 5) に対する結合を評価した。脂質小胞は 100  $\mu$ M の濃度のものを用いた。個々の実験データは最大結合値を 100 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している。

A.



同志社大学修士論文（島崎、2015）より引用

B.



C.

Consensus motif	K*	X <sub>n</sub>	(K/R) X R*
AKT	13 H <b>K</b> R G E Y I K T - - - W - <b>R</b> P <b>R</b> Y		26
PLC1delta	29 L <b>K</b> V K S - - S S - - - W R <b>R</b> E <b>R</b> F		41
BCR-ABL	710 L <b>K</b> D S F M V E L V E G A R <b>K</b> L <b>R</b> H		727

**図 6. p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識部位における塩基性アミノ酸のアラニン置換変異はその結合を減弱させる**

(A) pET 発現系を用いて精製した p210 BCR-ABL PH ドメインの各アラニン置換変異体 (K711A, R723A, K724A, R726A) の最終標品を CBB 染色により確認した。矢印は各変異体タンパク質のバンドを示している。

(B) 固相化させた p210 BCR-ABL PH ドメインの各アラニン置換変異体の、各リガンドリン脂質含有小胞(構成脂質モル比, PC: 各リン脂質: ビオチン化 PE = 85: 10: 5) に対する結合を評価した。脂質小胞は 100  $\mu$ M の濃度のものを用いた。なお、個々の実験データは野生型 p210 BCR-ABL PH ドメインの結合を 100 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している ( $n=3$ ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs wild-type, Tukey-Kramer ANOVA)。各リン脂質の構造を上部に示している (R はアシル基を示す)。

(C) 各タンパク質の PH ドメイン (Phospholipase C (PLC)- $\delta$ , AKT, p210 BCR-ABL) におけるリガンド認識部位の配列比較を行った。黒く塗りつぶした領域はコンセンサス配列中の塩基性アミノ酸を示す。アスタリスクを記した 2 つのアミノ酸は、リガンドリン脂質の隣接する 2 つのリン酸基との間に水素結合を形成することが知られている部位である。



### 3. p210 BCR-ABL PH ドメインの病理的機能解析

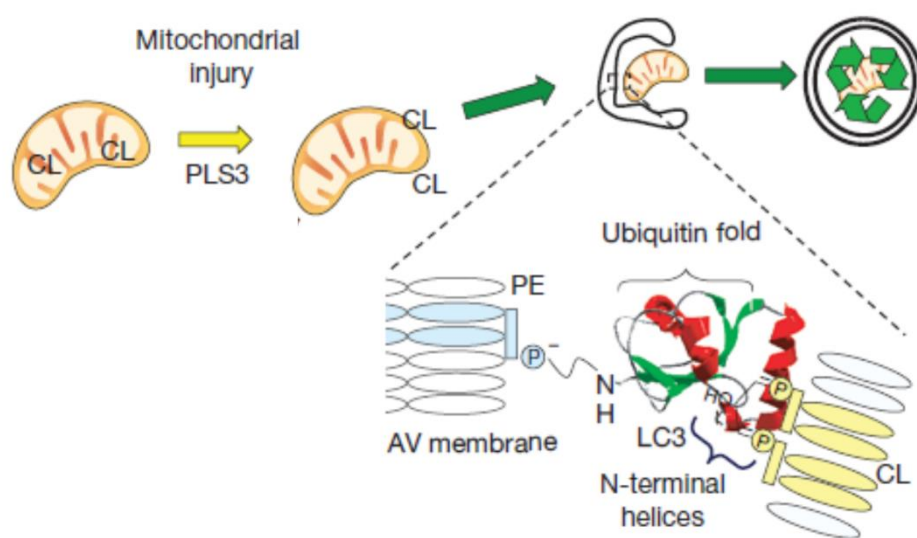
#### 3-1. 概要

p210 BCR-ABL は CML の主要な病原因子であり、そのチロシンキナーゼドメインが白血球がん化のドライバー因子であるとされる。その一方で、キナーゼドメイン以外のドメインも CML 病態に関与することが判明しつつあるが、唯一 PH ドメインに至ってはその病理的意義は不明のままである。そこで本研究では、前項の研究から得られた知見と、CL は細胞内ではミトコンドリア固有のリン脂質である点に着目し、いまだ明らかにされていない p210 BCR-ABL PH ドメインとミトコンドリアとの相互作用の有無、さらにその病理的意義を解析することを目的とした。

CL はミトコンドリアに特徴的なリン脂質であり、定常時ではその大部分はミトコンドリア内膜に限定して局在する<sup>43</sup>。その一方で、ミトコンドリア特異的なマクロオートファジーであるマイトファジー誘導時には、CL は外膜へと表出し、被分解ミトコンドリアの指標として機能することで、不良ミトコンドリアの分解、除去に働くことが知られている<sup>37</sup>。そこで我々はまず、p210 BCR-ABL を一過性に発現させた HEK293 細胞を、マイトファジー誘導作用をもち CL の表出を促進させることが知られている脱共役剤 CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine) により刺激し、p210 BCR-ABL の細胞内局在性を検討した。その結果、p210 BCR-ABL は刺激に応じてミトコンドリアへと集積し、その縁を取り囲むような構造体（以後この構造をリング様構造とする）を形成することを見出した。その一方で、CL 結合変異体として用いた R726A 変異型 p210 BCR-ABL ではリング様構造数およびその形成率の有意な減少が認められた。この結果は、p210 BCR-ABL が PH ドメイン依存的にミトコンドリアへとその局在性を変化させたことを示している。また刺激後の細胞から CCCP を除去すると、リング様構造形成率が減少したことから、この局在性変化は可逆的な現象であることが判明した。

マイトファジーにおいてミトコンドリア外膜上に表出した CL は、オートファゴソーム形成やその伸長に必須のタンパク質である LC3 (microtubule-associated protein-1 light chain 3) により認識されることで、被分解ミトコンドリアのオートファゴソームへの取り込みを促進すると考えられている<sup>37</sup> (図 7)。そこで私は、複数の指標を基に

p210 BCR-ABL のミトコンドリアへの局在性変化をもたらすマイトファジーへの影響について解析した。その結果、R726A 変異型 p210 BCR-ABL 発現細胞では CCCP 刺激に応じたマイトファジーの亢進が認められたのに対して、野生型 p210 BCR-ABL 発現細胞においてはマイトファジーが抑制されていることを見出した。またこの抑制は ABL チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブ存在下でもみられたことから、キナーゼ活性非依存的な抑制効果であることが示唆された。また CCCP 刺激後の細胞内活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生を評価したところ、R726A 変異型 p210 BCR-ABL 発現細胞に比べて、野生型発現細胞において有意な ROS 産生の増加が認められた。以上より、p210 BCR-ABL の PH ドメイン依存的なマイトファジー抑制により不良ミトコンドリアが蓄積し、その結果細胞内 ROS 産生が増加する可能性が示唆された。



Nat. cel. biol., 15, 2013, 1197- より改変

### 図 7. CL 表出により進行するマイトファジーの概略図

ミトコンドリアがストレスに晒され損傷すると、ミトコンドリア内膜の CL が、CL 転移酵素の一つである PLS3 (Phospholipid scramblase 3) により外膜へと輸送される。表出した CL は、オートファゴソームの PE との共有結合によって局在化した LC3 により認識されることで、損傷ミトコンドリアのオートファゴソームへの取り込

みが実行される。続くオートファゴソームへのリソソームの融合により、取り込まれたミトコンドリアが分解される。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 細胞培養およびトランスフェクション

HEK293 細胞（ヒト胎児腎臓由来）を 12 穴プレート (IWAKI)、24 穴プレート (IWAKI)、ガラスボトムディッシュ (Greiner) 上に培養した。細胞の剥離を抑制するために、ポリ L リジン（ペプチド研究所）を複数穴プレートには 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、ガラスボトムディッシュには 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でコートした。培地には 10% 非働化ウシ胎児血清およびペニシリン、ストレプトマイシンを含有した DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) 培地を用い、37°C の 5%  $\text{CO}_2$  恒温培養器にて培養した。トランスフェクションは、サブコンフルエントに達した HEK293 細胞に対し、導入プラスミドを Lipofectamine 3000 (Thermo) の常法に従って行った。

### 3-2-2. SDS-PAGE およびウエスタンブロットティング

24 穴プレートより回収した HEK293 細胞から細胞懸濁液を調整し、SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。COX IV や LC3、 $\beta$ -actin の分離にはアクリルアミド濃度 16% のゲルを、チロシンリン酸化タンパク質の分離にはアクリルアミド濃度 10% のゲルを、p210 型 BCR-ABL の分離にはアクリルアミド濃度 5% のゲルを、タンパク質の濃縮には 3.8% アクリルアミドゲルをそれぞれ用いた。2-2-4) 項と同様にして BCA 法により算出した各サンプルのタンパク質濃度を基に、等量の総タンパク質を泳動した。泳動分離後のタンパク質は PVDF (polyvinylidene fluoride) (Merck) 膜に転写した。5% スキムミルクによるブロッキング反応後、1 次抗体として 2000 倍希釈した抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma)、2000 倍希釈した抗 COX IV モノクローナル抗体 (CST)、200 倍希釈した抗 LC3 モノクローナル抗体 (nanoTools)、2000 倍希釈した抗  $\beta$ -actin ポリクローナル抗体 (MBL)、2000 倍希釈した抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (Merck)、をそれぞれ用いた。2 次抗体には 5000 倍希釈した HRP 標識抗 IgG 抗体 (CST) を使用した。

### 3-2-3. 細胞生存率の測定

96 穴プレートに培養した HEK293 細胞をトランスフェクション後、20  $\mu\text{M}$  CCCP により任意の時間刺激した。Cell Count Reagent SF (Nacalai) を添加し  $\text{CO}_2$  インキュベ

ーターにて 1.5-2 時間培養した後、吸光度計を用いて波長 570 nm で取得した測定値を基に細胞生存率を評価した。

#### 3-2-4. 免疫蛍光染色および蛍光プローブによる細胞染色

35 mm ガラスボトムディッシュ (Greiner) に培養した HEK293 細胞をトランスフェクション後、CCCP 処理を所定の時間、濃度で行った。PBS による洗浄後、3%パラホルムアルデヒドにより室温で 20 分間処理し細胞を固定した。PBS による洗浄後、PBS に希釈した 0.2% Triton X-100 により室温で 15 分間処理し、細胞透過を行った。再び PBS により洗浄を行った後、PBS に希釈した 3% BSA で室温、30 分間処理しブロッキングを行った。1 次抗体には 500 倍希釈した抗 FLAG モノクローナル抗体 (Sigma) と 250 倍希釈した抗 COX IV モノクローナル抗体 (CST) を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS による洗浄後、2 次抗体として 2000 倍希釈した Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) および 2000 倍希釈した Alexa546 結合抗ウサギ IgG 抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。染色細胞の蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) により取得した。

マイトファジーの検出のため、35 mm ガラスボトムディッシュに培養したトランスフェクション後の HEK293 細胞を、FluoreBrite™ DMEM (Thermo) に希釈した 100 nM Mtpagy Dye (Dojindo) により 37°C で 30 分間染色した。この蛍光色素はミトコンドリアに滞留し、酸性条件下において蛍光を発するという特徴をもつ。DMEM による洗浄後、細胞を 20 μM CCCP、37°C で 24 時間処理した。FluoreBrite™ DMEM による洗浄後、同じく FluoreBrite™ DMEM に希釈した 1 μM Lyso Dye (Dojindo) により細胞を 37°C で 30 分間染色した。FluoreBrite™ DMEM による洗浄後、染色細胞の蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510) により取得した。

#### 3-2-5. 細胞内 ROS 産生量の測定

ROS の蛍光プローブである CM-H<sub>2</sub>-DCF-DA (chloromethyl-2,7-dichlorofluorescein diacetate) (Thermo) を用い、細胞内 ROS 産生量をフローサイトメトリーにより測定した。12 穴プレート上に培養した HEK293 細胞をトランスフェクション後、20 μM CCCP、37°C で 24 時間処理した。細胞をトリプシン/EDTA 処理により回収した後、

無血清最小培地である Opti-MEM (Gibco) により希釈した 5  $\mu$ M DCF-DA により 37°C で 30 分間暗所にて染色した。PBS による洗浄後、細胞を 2%BSA を含んだ PBS 中に溶かし 488 nm の波長のレーザーにより励起させた。525 nm のフィルターを用い、蛍光強度をフローサイトメーターにより測定した (BD FACS II and FACSDiva software)。ROS 産生量は DCF の平均蛍光強度 (MFI: mean fluorescence intensity) により評価した。なお ROS 産生量の評価には、3 回の独立した実験ごとに、各条件の平均蛍光強度の測定値の総和を 6 に標準化した任意単位を用いた。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. p210 BCR-ABL は CCCP 処理に応じて PH ドメイン依存的にミトコンドリアへと移行する

CLはミトコンドリア固有のリン脂質であるが、その65%以上はミトコンドリア内膜に限定し局在することが知られている<sup>43</sup>。前章の結果より明らかとなったように、p210 BCR-ABL PH ドメインがCLを強力に認識することを考えると、CLがミトコンドリアの外膜に発現されるような条件下では、p210 BCR-ABLはそのPHドメイン依存的にミトコンドリアへと局在性を変化させることが推測される。しかしながら、これまでにそのような報告はない。そこで私は、この点について検討を行った。

CLのミトコンドリア外膜への表出を伴う細胞内応答の1つとしてマイトファジーが挙げられる<sup>37</sup>。マイトファジーはミトコンドリア特異的なマクロオートファジーであり、不良なミトコンドリアをオートファゴソームにより隔離し、それに続くリソソームとの融合により分解することで、細胞内のミトコンドリア恒常性維持に働く。マイトファジー実行の際、CLが外膜に表出したミトコンドリアはオートファゴソームにより認識され取り込まれることから、CLは被分解ミトコンドリアの指標として機能していると考えられている。まず私は、HEK293細胞にFLAGタグ融合野生型p210 BCR-ABL、およびR726A変異型p210 BCR-ABLを一過性にそれぞれ発現させ、野生型および変異型の細胞内発現量が同等であることを確認した(図8A)。免疫蛍光細胞染色による野生型およびR726A変異型p210 BCR-ABLの細胞内局在性の解析を行ったところ、野生型、変異型共に細胞膜と細胞質を中心とした局在性を示した(図8B)。この局在性は先行研究において報告されているものと一致している<sup>22,44</sup>。続いて、ミトコンドリア外膜へのCL表出を誘導するために、マイトファジー誘導剤であるCCCPにより細胞を刺激した場合のp210型BCR-ABLの細胞内局在性を検討した。その結果、野生型発現細胞においてp210 BCR-ABLがミトコンドリアの縁を取り囲んだリング様構造体の出現が観察された(図8B)。さらに、このリング様構造陽性細胞率は、野生型p210 BCR-ABL発現細胞と比較し、いずれの刺激時間(1時間、3時間、6時間)においても変異型発現細胞では有意に減少していた(図8C)。また、1細胞あたりのリング様構造数においても、変異型発現細胞における有意な減少が認められた(図8D)。以上の結果から、野生型p210 BCR-ABLはミトコンドリア

のストレスに応答して、PH ドメインとミトコンドリア外膜上の表出 CL との相互作用を介して、ミトコンドリアへとその細胞内局在性を速やかに変化させること、が示唆された。また、CCCP の除去によってリング様構造陽性細胞率は容易に減少したことから、このミトコンドリアへの移行は可逆的な現象であることが示された (図 8 E, F)。

### 3.3.2 p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的に CCCP 誘導性マイトファジーを抑制する

マイトファジーは、オートファゴソームの形成、および分解対象ミトコンドリアのオートファゴソームへの取り込みという 2 つの段階を経て進行する。ミトコンドリアのストレスに応じて外膜に表出した CL は、オートファゴソーム上に存在しその伸長、形成に必須である LC3 タンパク質により認識され、その結果、ミトコンドリアのオートファゴソームへの取り込みが実行される<sup>37</sup>。次いで、オートファゴソームはリソソームと融合することでファゴリソソームを形成し、積荷であるミトコンドリアの選択的分解を引き起こされる。そこで私は、p210 BCR-ABL のミトコンドリアへの結合が、マイトファジー実行にどのような影響を及ぼすのかを解析した。まず初めに、野生型 p210 BCR-ABL および変異型 R726A をそれぞれ一過性に発現させた HEK293 細胞を用いて、CCCP 誘導性マイトファジーにおけるファゴリソソームの形成について解析した。まず、長時間 (24 時間) の CCCP 処理による細胞毒性に、野生型 p210 BCR-ABL および変異型発現細胞の間で差はみられないことを確認した (図 9 A)。続いて、24 時間の CCCP 処理後のミトコンドリアとリソソームの共局在性、即ちファゴリソソームの形成を蛍光プローブを用いて評価したところ、p210 BCR-ABL 未発現細胞および変異型 R726A 発現細胞においてはファゴリソソームの形成がみられたが、野生型発現細胞においては CCCP 刺激に応じたファゴリソソーム形成は認められなかった (図 9 B)。これは野生型 p210 BCR-ABL により CCCP 誘導性マイトファジーが抑制されていることを明瞭に示している。

この CCCP 誘導性マイトファジー抑制への p210 BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性の関与を検討するため、第 1 世代 TKIs であるイマチニブを用いた解析を行った。20  $\mu$ M CCCP 共存在化における亜細胞毒性量 (3  $\mu$ M) のイマチニブが、p210 BCR-



ABL 発現によるチロシンリン酸化を効率よく阻害することを確認した (図 9 C)。続いて、ファゴリソーム形成を指標にイマチニブ存在下における CCCP 誘導性マイトファジーへの影響を解析したが、イマチニブ非存在下と同等のマイトファジー誘導が確認された (図 9 D)。この結果は、本マイトファジー阻害機構が p210 BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性非依存的であることを示唆している。

p210 BCR-ABL によるマイトファジー抑制について、LC3 の活性化体である LC3 II、ミトコンドリア内膜のタンパク質である COX IV、および p210 BCR-ABL の発現量を指標にさらなる解析を行った。オートファジー、あるいはマイトファジーの活性化の際に、LC3 は段階的なプロセッシングを受けて LC3 II へと成熟する<sup>45</sup>。野生型 p210 BCR-ABL および変異型 R726A 発現細胞どちらにおいても、CCCP 処理による p210 BCR-ABL 発現量の減少がみられたが、両者の間に有意な差は認められなかった (図 6 E)。CCCP 刺激により LC3 II 産生量の増加がみられたが、こちらも両者の間に有意な差は認められなかった (図 9 E)。CCCP 未刺激の定常時においても LC3 II が産生されているが、これは BCR-ABL が MAPK15 の活性化を介して定常時のオートファジーを促進する、という先行研究と一致すると考えられた<sup>46</sup>。その一方で、変異型 R726A 発現細胞においては、CCCP 刺激時間に依存的な COX IV の発現量減少がみられたが、野生型発現細胞においてはその減少は有意に抑制されていた (図 9 E)。また R726A 発現細胞でみられた COX IV の発現量減少は、H<sup>+</sup>-ATPase 特異的阻害剤でありオートファゴソームとリソソームの融合阻害に働く bafilomycin A1 により解除された<sup>47</sup> (図 9 F)。これは、この COX IV の発現量減少がファゴリソーム依存的な分解によることを示している。

### 3-3-3. p210 BCR-ABL は CCCP により誘導される ROS 産生を増強する

ストレスを受け損傷した不良なミトコンドリアから電子が漏出すると、スーパーオキシド等の ROS 産生が引き起こされる<sup>48</sup>。過剰な ROS 産生は脂質やタンパク質の過酸化を誘導し細胞内のレドックス環境を変化させ、細胞内恒常性を崩壊させる。こうした現象に対して、マイトファジーによる不良ミトコンドリアの選択的分解が細胞内 ROS 産生を減少させることが報告されている<sup>49</sup>。そこで我々は、野生型 p210 BCR-ABL および変異型 R726A 発現細胞において、CCCP によりストレスを受けたミ

トコンドリアから産生される ROS に対する解析を行った。ROS の蛍光プローブである CM-H<sub>2</sub>-DCF-DA の細胞内蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定し、ROS 産生を評価した。その結果、CCCP により誘導される ROS 産生量の増加が野生型 p210 BCR-ABL の発現により増強されることが明らかとなった。その一方で、この ROS 産生増加は変異型 R726A 発現細胞では野生型と比較して有意に減少していた (図 10)。このことから、p210 BCR-ABL の PH ドメイン依存的なマイトファジー抑制により不良ミトコンドリアが蓄積し、その結果細胞内 ROS 産生量の増加が誘導される、と考えられた。

### 3-4. 考察

本研究により、CCCPによるマイトファジー誘導時において p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトコンドリアへと集積することが明らかとなった。 p210 BCR-ABL PH ドメインが CL をリガンドとして認識すること、マイトファジー誘導時にはミトコンドリア外膜上に CL が表出すること、CL 結合変異体である R726A p210 BCR-ABL ではミトコンドリアへの集積が減弱すること、以上のことからこの局在性変化は PH ドメインと CL の相互作用を介していると考えられた。ミトコンドリア内膜に格納された CL の外膜への輸送には、PLS3 (phospholipid scramblase 3) と NDPK-D (nucleoside diphosphate kinase D) が重要な役割を果たしている。RNA 干渉法によりこれらのタンパク質の発現を減弱させた細胞では、CCCP 刺激時のミトコンドリア外膜の CL 量が減少し、その結果マイトファジーが抑制されることが報告されている<sup>37,50</sup>。これらの事実は、CCCP 誘導時に生じる p210 BCR-ABL のミトコンドリアへの局在性変化が、PH ドメインと CL との相互作用による現象であることを支持するものである。また、本研究において、CCCP 除去により p210 BCR-ABL のミトコンドリア移行が速やかに解除されることが明らかとなった。これは外膜に表出した CL が再び内膜へと移行したことを示唆している。その一方で、マイトファジー実行が中断された際に外膜に移行した CL が内膜へと再輸送されるという報告はない。従って、本知見はミトコンドリア外膜へと表出した CL が内膜へと速やかに再輸送されうることを初めて示唆したものである。

CCCP 刺激時にミトコンドリアへと集積した p210 BCR-ABL は、後続するマイトファジーを抑制することが明らかとなった。また、TKI であるイマチニブを用いた実験から、本阻害機構はチロシンキナーゼ活性非依存的なものであることが示唆された。これらを踏まえると、p210 BCR-ABL だけでなく BCR タンパク質も同様にマイトファジー抑制に働く可能性がある。BCR は PH ドメインの他に、DH ドメインと GAP ドメインの 2 つの酵素活性領域をそれぞれ有するタンパク質である。また、その DH ドメインを介したケラチノサイトの脱分化促進や<sup>51</sup>、GAP ドメインを介した神経細胞の樹状突起分枝の制御<sup>52</sup>、アストロサイトの細胞極性の決定<sup>53</sup>等、様々な機能を果たすことが報告されている。しかしながら、BCR のミトコンドリア機能への関与や、PH ドメインの機能に関連する知見は今までのところ全く存在していない。従って、今回の結

果は BCR PH ドメインの生理的あるいは病的な機能の解明に向けた一助となることが期待される。

p210 BCR-ABL により CCCP 誘導性マイトファジーが阻害されていた際には、LC3 は活性化し LC3 II が生じる。LC3 II は C 末端領域を介しオートファゴソーム上に局在する一方で、N 末端の塩基性パッチ領域を介して、不良なミトコンドリア外膜上に表出した CL と結合する (図 7)。その結果、LC3 II を介したオートファゴソームへのミトコンドリアの取り込みが実行されると考えられている<sup>37,54</sup>。従って、p210 BCR-ABL PH ドメインが、CL への結合に対して LC3 II と競合した結果、オートファゴソームへのミトコンドリアの取り込みが抑制されマイトファジー阻害に至った可能性が考えられた。この点に関しては、今後さらなる検討が必要である。

本研究により、p210 BCR-ABL によるマイトファジー抑制の結果、細胞内 ROS 産生が増強されることが明らかとなった。過剰な ROS は細胞死を誘導するが、適度な ROS はがん細胞の増殖シグナルを活性化させるシグナル分子として機能することが知られている<sup>55</sup>。先行研究において、CML 細胞を含むがん細胞は正常細胞に比べて高いレベルの ROS 産生を保持していること、それによる下流因子の活性化ががん細胞の増殖に寄与することが判明している<sup>55,56</sup>。さらに、CML 細胞あるいは CML 幹細胞において、高レベルの ROS 産生により遺伝的不安定性の亢進が誘導された結果、DNA 損傷が高頻度に生じることによって、CML の悪性化および TKI 耐性体の出現が促進されることが報告されている<sup>56,57</sup>。これらを踏まえると、p210 BCR-ABL PH ドメインによるマイトファジー阻害は、不良なミトコンドリアを ROS の供給源として保持することで CML 細胞の増殖促進に働く可能性を示唆しており、p210 BCR-ABL PH ドメインが CML 治療戦略における新たな創薬標的となりうる可能性を示している。

近年、造血幹細胞におけるマイトファジーの役割と、CML 幹細胞のミトコンドリア依存性について非常に興味深い報告が相次いでいる。正常な造血幹細胞は解糖系依存的なエネルギー代謝を行っており、マイトファジーを介して高品質なミトコンドリアを最低限の量に保持していること、マイトファジーの破綻により造血幹細胞の増殖、維持、分化に異常をきたすことが報告されている<sup>58,59</sup>。その一方で、最近、CML 幹細胞は膜電位の低下した、呼吸鎖活性の比較的低い不良なミトコンドリアを保持しているが、そのミトコンドリアに一層の機能破綻を誘導すると、CML 幹細胞の増殖、維持自体がで

きなくなることが示されている<sup>60</sup>。また別の研究でも同じく、CML 幹細胞の生存はミトコンドリアを介した酸化的代謝に依存していること、さらに TKI とミトコンドリアタンパク質の翻訳阻害剤の共投与により CML 幹細胞が選択的に根絶されること、を報告している<sup>61</sup>。これらの知見を踏まえると、正常な造血幹細胞とは異なるミトコンドリアに依存した CML 幹細胞特有の代謝機構の形成に、p210 BCR-ABL PH ドメインを介したマイトファジー阻害によるミトコンドリアの保持が寄与している可能性がある。このことから、p210 BCR-ABL PH ドメインを標的とした新規 CML 治療戦略が支持される。

今後の展開として、造血系細胞を用いた p210 BCR-ABL PH ドメインの病理的機能の解析を継続する必要があると考えている。今回用いた HEK293 細胞はヒト胎児腎臓由来の上皮様細胞であり、p210 BCR-ABL が実際に発がんをもたらす造血系の細胞とはその形態、機能は大きく異なる。そのため、本研究において明らかにしたマイトファジーの阻害が、実際に CML 細胞あるいは CML 幹細胞において生じているのか、それがどのような病理的な意義をもつのかについては、今後の重要な研究課題である。具体的には、p210 BCR-ABL の発現を誘導することでがん化することが知られているマウス由来骨髄系細胞株である Ba/F3 細胞や、CML 細胞株である K562 細胞を用いて、マイトファジー誘導時のミトコンドリアへの局在性変化や、マイトファジー阻害、ROS 産生、さらには遺伝的不安定性やミトコンドリア膜電位、細胞増殖能などを指標にした解析が必要だと考えている。また CML 幹細胞についても、まずはマウス由来の造血幹細胞を用い、同様に評価していく必要がある。

本研究より得た知見から、p210 BCR-ABL PH ドメインの病理的機能に関する仮説を提唱した (図 11)。p210 BCR-ABL PH ドメイン依存的にマイトファジーが阻害されることによって蓄積した不良ミトコンドリアが ROS の発生源となり、CML 細胞内の ROS 産生量が増加することで、CML 細胞の増殖や遺伝的不安定性の亢進に働く。また CML 幹細胞においては、マイトファジー阻害がミトコンドリアの保持に働き、酸化的リン酸化を介したエネルギー代謝に依存した CML 幹細胞特有の代謝機構の形成に寄与する可能性も示唆している。

本研究室では並行して p210 BCR-ABL PH ドメイン特異的なペプチド性制御分子の開発を進めている。特許出願準備中につき配列は明示できないが、本研究室の独自技術

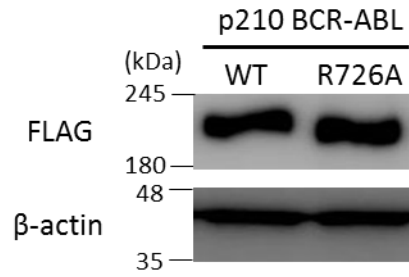
である多価型ペプチドライブラリーシートスクリーニング法により、p210 BCR-ABL PH ドメイン結合モチーフの取得に成功している。取得したペプチドが *in vitro* で p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド認識部位へと結合し、p210 BCR-ABL PH ドメインと CL との相互作用を阻害しうることを見出している。また、細胞レベルでの検討も進めており、本ペプチド投与により、CCCP 刺激により誘導される p210 BCR-ABL のミトコンドリアへの移行が抑制されること、その結果、p210 BCR-ABL PH ドメイン依存的なマイトファジー抑制が解除されること、を見出している。これらの結果は、本ペプチドが p210 BCR-ABL PH ドメイン制御分子として機能することを強く示唆するものである。今後は、本ペプチドが、CML 幹細胞の酸化的リン酸化を介した代謝経路に対してどのような影響をもたらすのか、またその結果、CML 幹細胞の増殖、維持に対してどのように作用するかを検討し、p210 BCR-ABL PH ドメイン制御ペプチドの新規 CML 治療薬としての基盤を確立していく予定である。また、本 PH ドメイン制御分子は、プロテインノックダウン法にも応用できると期待される。プロテインノックダウン法とは、内在性ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とをそれぞれのリガンドを連結した人工分子により架橋し、標的タンパク質のポリユビキチン化、それに続くプロテアソーム系による分解を誘導する手法である<sup>62</sup>(図 12)。TKI を p210 BCR-ABL のリガンドとすることで、本法により p210 BCR-ABL 特異的な分解が誘導できることが既に示されている<sup>63</sup>。だが TKI をリガンドとする限り、臨床上大きな問題となっている耐性体を克服することは依然できない。そこで PH ドメイン特異的なプローブを p210 BCR-ABL のリガンドとしてプロテインノックダウン法に応用することで、TKI 耐性体にも適応可能な全く新しい CML 治療薬の開発につながることを期待できる。

### 3-5. 結論

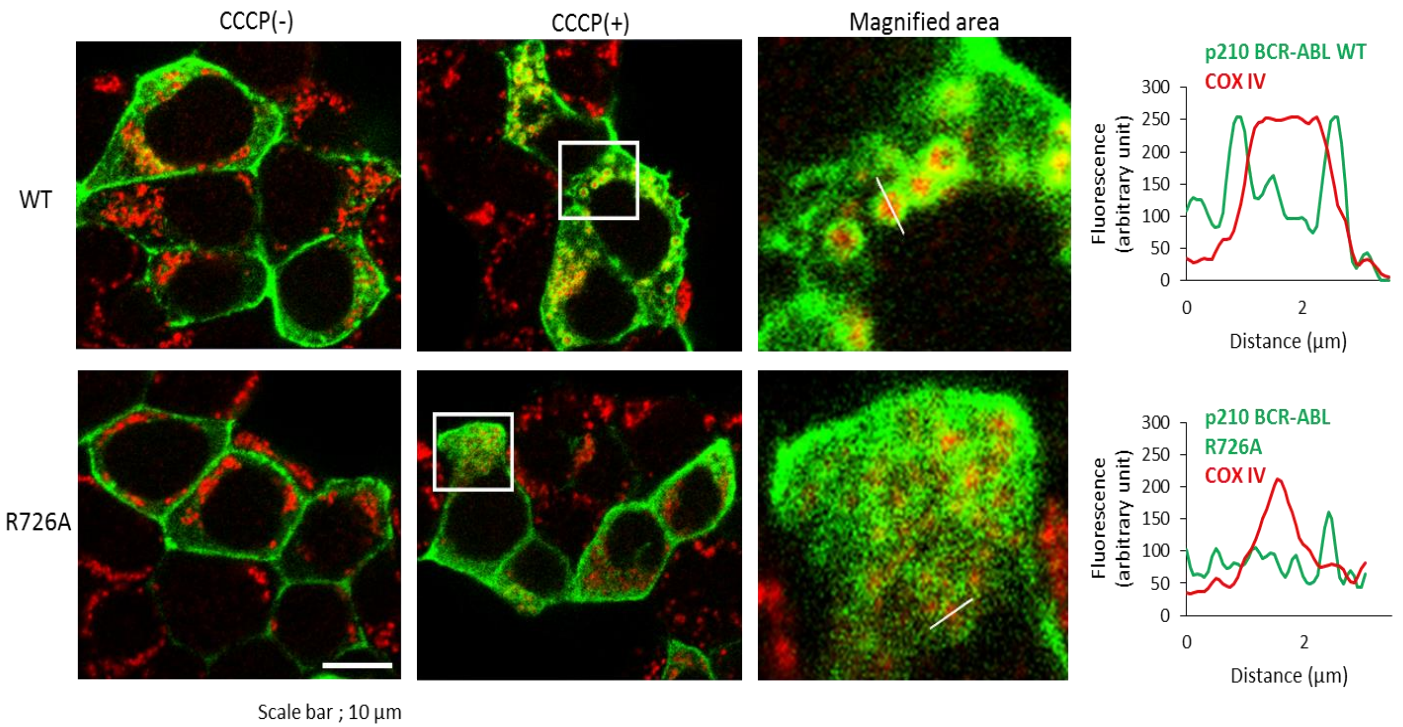
本研究から、CCCP 誘導性マイトファジーの際に p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトコンドリアへとその局在性を速やかに変化させること、この局在性変化は可逆的であることを見出した。さらに、ミトコンドリアに移行した p210 BCR-ABL がマイトファジーを抑制すること、それにより不良なミトコンドリアを蓄積させることで細胞内 ROS 産生増加に寄与することを明らかにした。

3-6. 図表

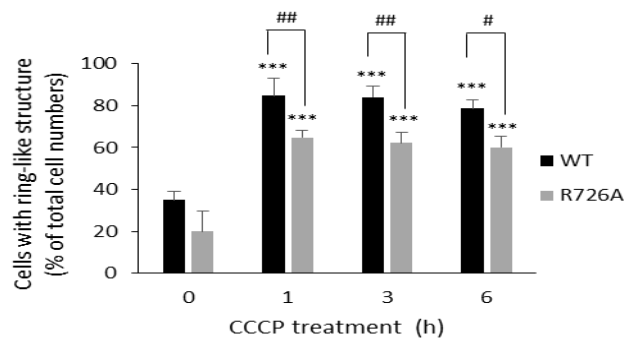
A.



B.

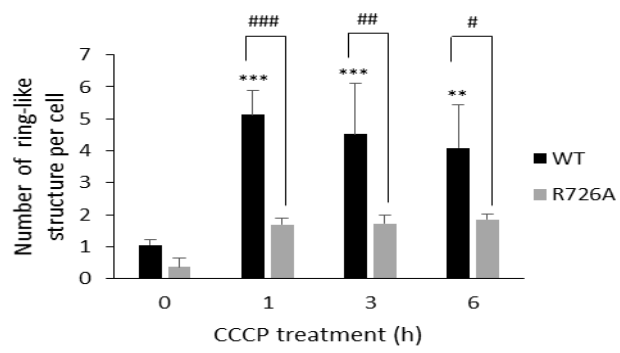


C.

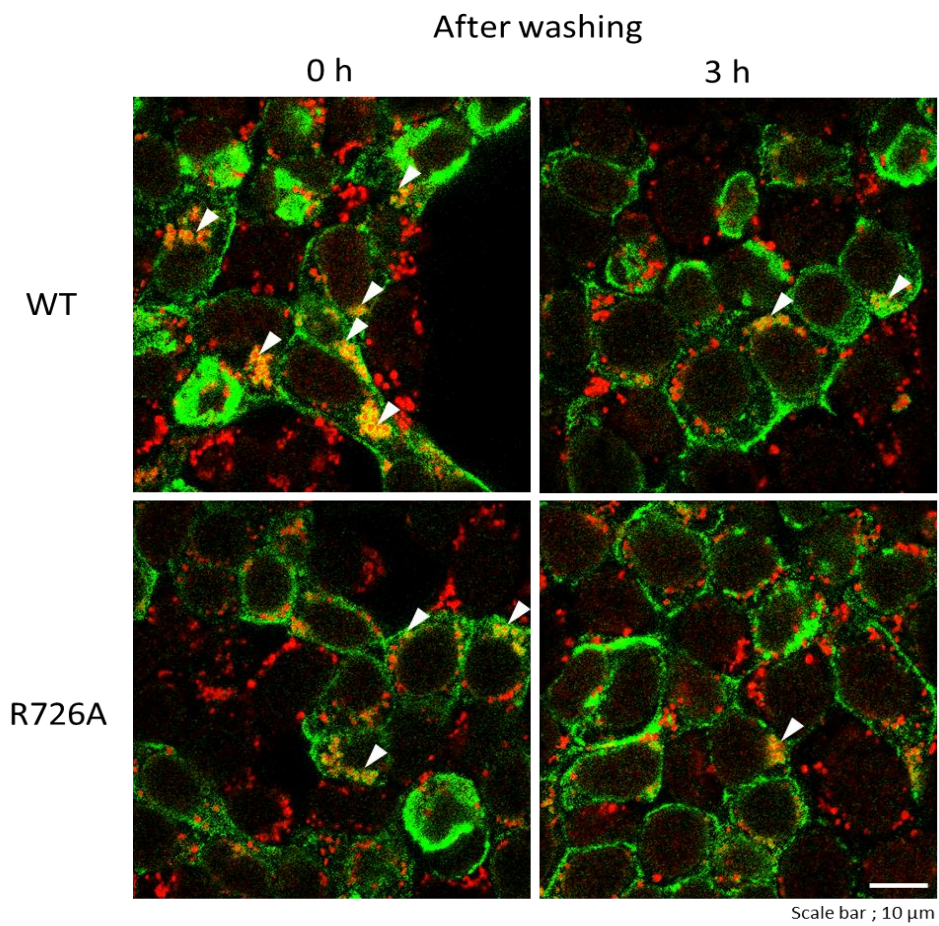




D.



E.



F.

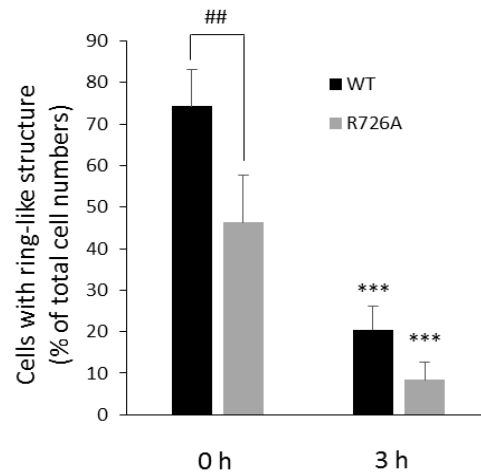


図 8. p210 型 BCR-ABL は HEK293 細胞において、CCCP 刺激によりミトコンドリアへと移行する。

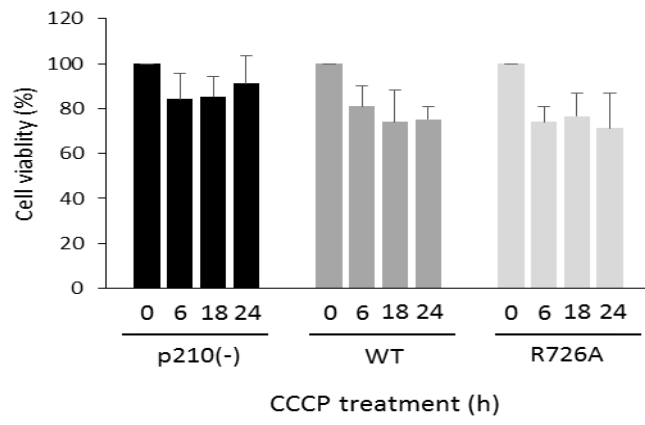
(A) FLAG タグ標識野生型 p210 BCR-ABL、および FLAG タグ標識変異型 R726A p210 BCR-ABL をそれぞれ一過性に発現させた HEK293 細胞中の、各 p210 BCR-ABL の発現量をウエスタンブロッティングにより解析した。検出には抗 FLAG 抗体を用いた。

(B-D) トランスフェクション後の細胞を 30  $\mu$ M CCCP で 3 時間 (B) あるいは記載の時間 (C, D) 処理した。細胞内の野生型あるいは変異型 p210 BCR-ABL (緑) は抗 FLAG 抗体により、ミトコンドリア (赤) は抗 COX IV 抗体を用いて標識し、それぞれの細胞内局在性を解析した。白枠は拡大した領域を示している。ミトコンドリアを通過するようにして描いた白線上の各蛍光強度を ImageJ ソフトウェア (NIH, USA) を用いて解析した (B)。p210 BCR-ABL と COX IV の共局在性を、リング様構造陽性細胞の割合 (C) および 1 細胞あたりのリング様構造数 (D) により評価した。なお、リング様構造とは p210 BCR-ABL が COX IV の縁を取り囲んでいる構造を示す。4 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している ( $n=4$ ;  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$  vs CCCP(-);  $\#p<0.05$ ,  $\##p<0.01$ ,  $\###p<0.001$ , Tukey-Kramer ANOVA)。

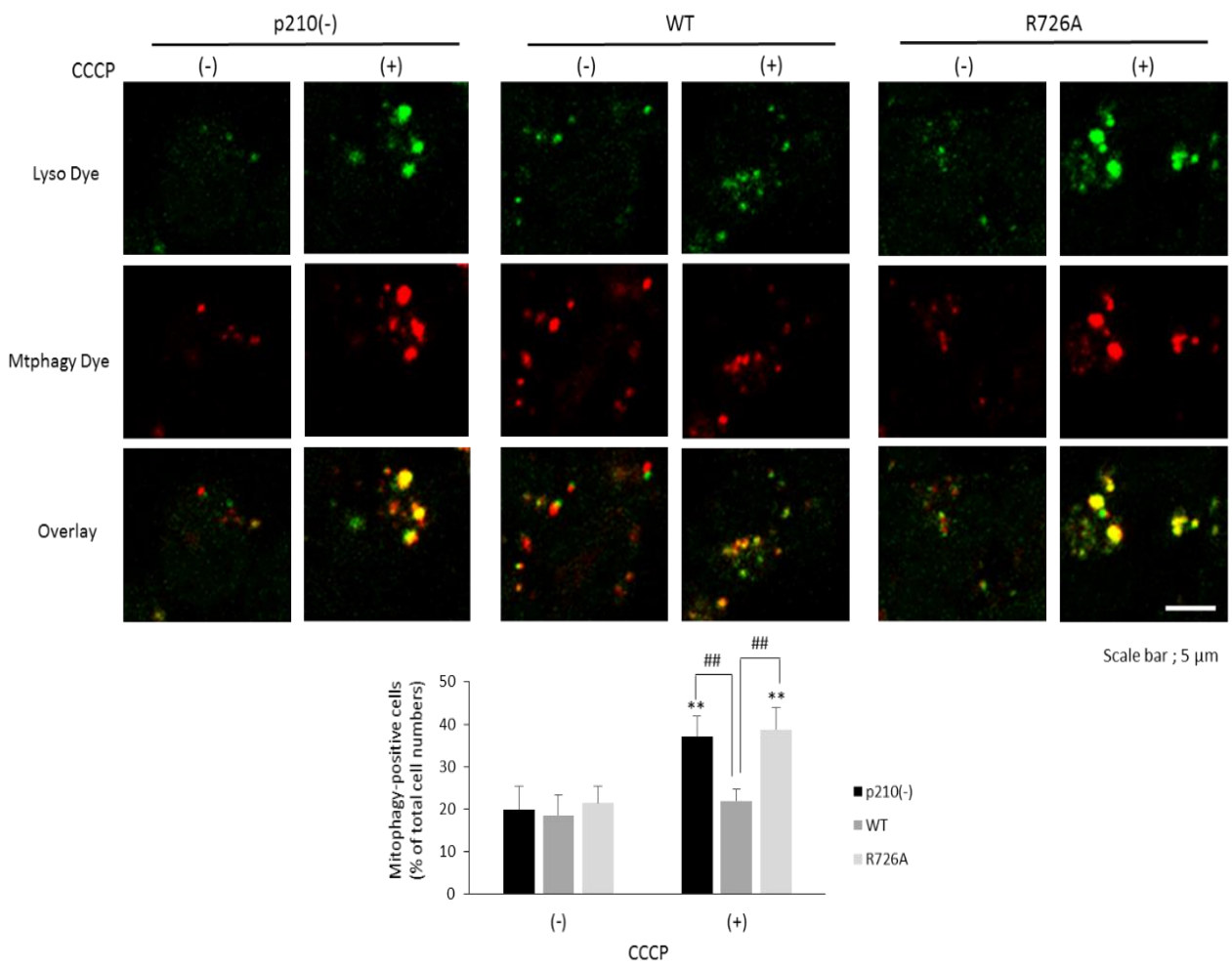
(E-F) トランスフェクション後の細胞を 30  $\mu$ M CCCP で 3 時間処理した。続く洗浄操

作と培地交換により CCCP を除去後、さらに 3 時間培養を行った。p210 BCR-ABL およびミトコンドリアの細胞内局在性解析は上記 (B-D) と同様にして行った (E)。p210 BCR-ABL と COX IV の共局在性を、リング様構造陽性細胞の割合により評価した (F)。白い矢印の頭はリング様構造を示している。4 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出している ( $n=4$ ;  $***p<0.001$  vs time 0;  $\#p<0.01$ , Tukey-Kramer ANOVA)。

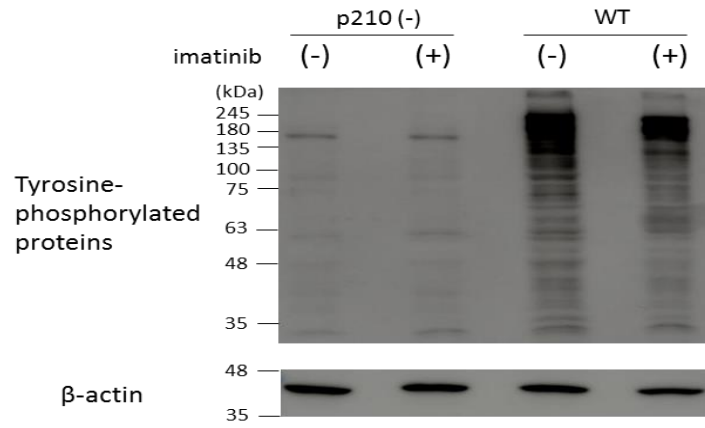
A.



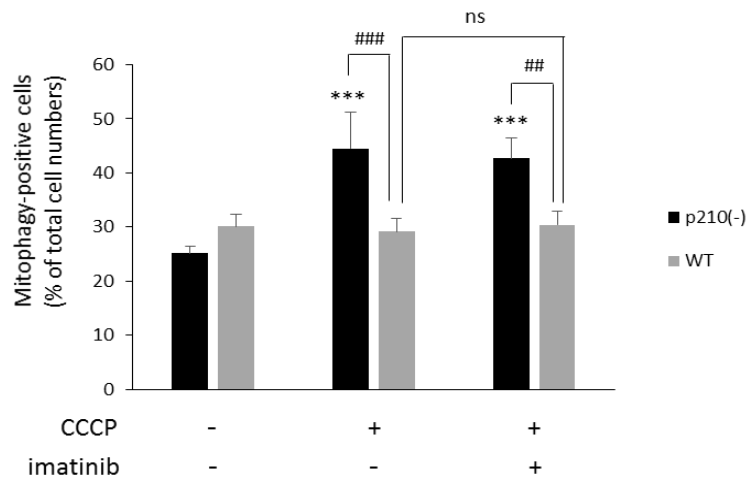
B.



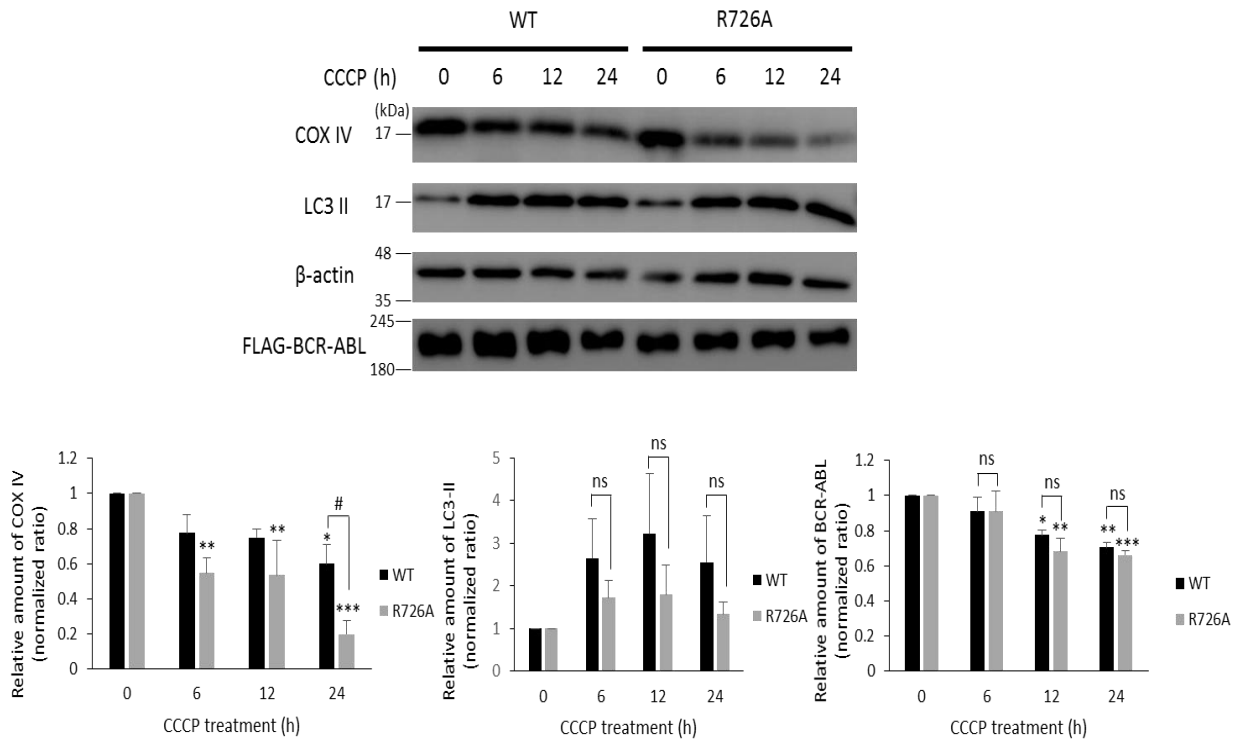
C.



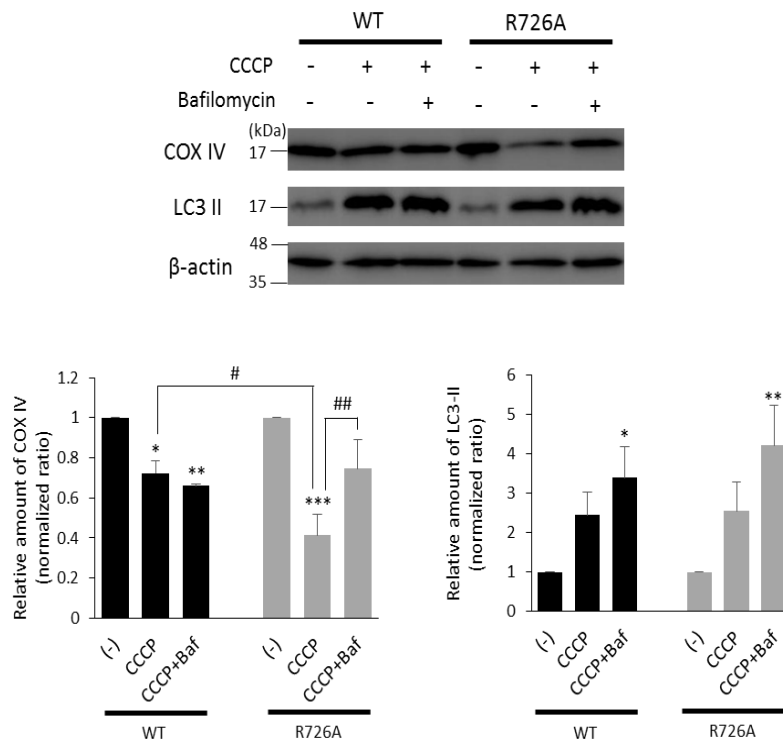
D.



**E.**



**F.**



**図 9. p210 BCR-ABL は CCCP 誘導性マイトファジーを PH ドメイン依存的に抑制する**

(A) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP で記載の時間処理した後、細胞生存率を評価した。実験データは CCCP 未刺激時のシグナル値を 100 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した。

(B) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP で 24 時間処理した。リソソームとミトコンドリアの細胞内局在性をそれぞれの蛍光プローブである Lyso Dye、Mtphagy Dye を用いて評価した (実験方法 3-2-4 項に記述)。マイトファジーをこれらの蛍光プローブの共局在性を示す細胞の割合で評価した。4 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した ( $n=4$ ;  $**p<0.01$  vs CCCP(-);  $##p<0.01$ , Tukey-Kramer ANOVA)。

(C) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 3  $\mu$ M イマチニブで 24 時間処理し、リン酸化チロシン残基を有するタンパク質をウエスタンブロッティングにより評価した。検出には抗リン酸化チロシン抗体を用いた。2 回の独立した実験のうち代表的なものを示している。

(D) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP と 3  $\mu$ M イマチニブ存在下、あるいは非存在下で 24 時間処理した。マイトファジーの検出は (B) と同様に行なった。4 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した ( $n=4$ ;  $***p<0.001$  vs CCCP(-);  $##p<0.01$ ,  $###p<0.001$ , Tukey-Kramer ANOVA)。

(E) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP で記載の時間処理し、COX IV、LC3 II、 $\beta$ -actin、FLAG タグ標識 p210 BCR-ABL の発現量を各抗体を用いたウエスタンブロッティングにより評価した。各タンパク質の発現量は内部標準である  $\beta$ -actin で補正し、未刺激時の各タンパク質発現量を 1 として標準化した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した ( $n=3$ ;  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$  vs time 0;  $#p<0.05$ ; ns is not significant, Tukey-Kramer ANOVA)。

(F) トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP と 100 nM bafilomycin A1 存在下、あるいは非存在下で 24 時間処理した。各タンパク質の発現をウエスタンブロットティングにより評価し、発現量を (E) と同様にして表した。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した ( $n=3$ ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs time 0; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ ; ns is not significant, Tukey-Kramer ANOVA)



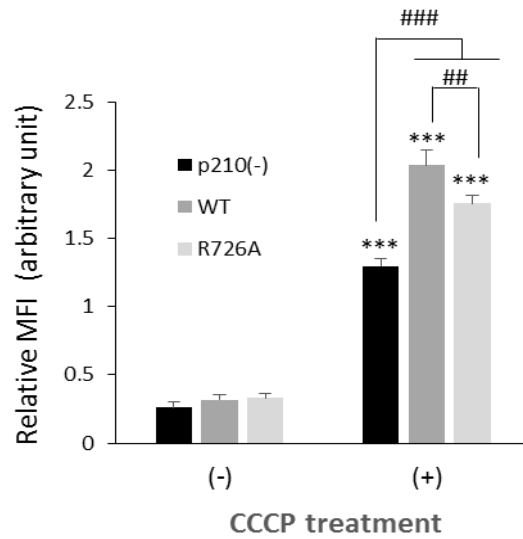


図 10. p210 BCR-ABL は CCCP により誘導される ROS 産生を PH ドメイン依存的に増強する

トランスフェクション後の HEK293 細胞を 20  $\mu$ M CCCP で 24 時間処理した。ROS の蛍光プローブである CM-H<sub>2</sub>-DCF-DA の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定し、細胞内 ROS 産生量を評価した。各回の実験データは相対化した平均蛍光強度で表した (標準化方法は実験方法 3-2-5 項に記載)。3 回の独立した実験から平均値および標準偏差を算出した ( $n=3$ ; \*\*\* $p<0.001$  vs CCCP(-); ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$ , Tukey-Kramer ANOVA)。

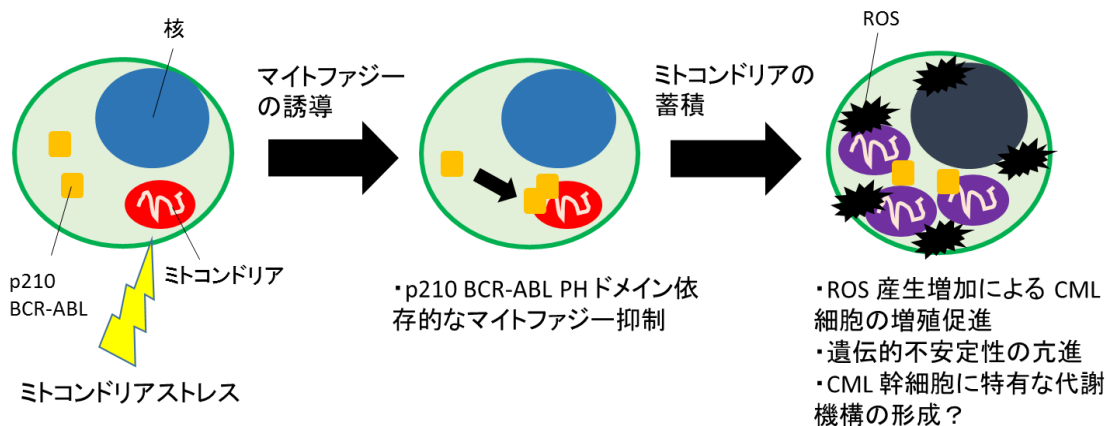
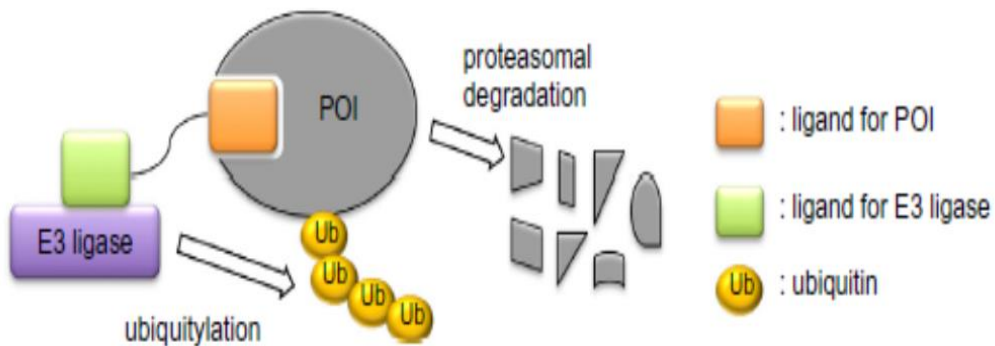


図 11. p210 BCR-ABL PH ドメインによるマイトファジー阻害の CML 細胞病理モデル

ストレスにより傷害を受けたミトコンドリアを除去するためにマイトファジーが誘導されるが、ミトコンドリアにリクルートされた p210 BCR-ABL がマイトファジーを阻害する。その結果、蓄積した不良ミトコンドリア由来の ROS により 1) CML 細胞の増殖の活性化、2) 遺伝的不安定性の亢進がもたらされ、CML の悪性化が進行する。また、造血幹細胞とは異なり酸化的代謝に依存するという、CML 幹細胞特有の代謝機構の形成に関しても、上記阻害機構が寄与している可能性がある。



Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016) 4865-4869 より引用

図 12. プロテインノックダウン法の概略

分解標的タンパク質 (POI) を E3 ユビキチンリガーゼと架橋し、POI のポリユビキチン化、それに続くプロテアソーム系による特異的分解を誘導する創薬技術である。

#### 4. 結語

本研究から、p210 BCR-ABL PH ドメインは CL、PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> をリガンドとして認識することが明らかにした。さらに、そのリガンド認識には、PH ドメインのコンセンサス配列内の K711、R723、K724、R726 の塩基性アミノ酸が関与すること、特に R726 がそのリガンド認識に最も寄与が大きいことを明らかにした。

ミトコンドリアへのストレスを感知して、p210 BCR-ABL は PH ドメイン依存的にミトコンドリアへとその細胞内局在性を速やかに変化させること、この局在性変化は可逆的であることを見出した。さらに、ミトコンドリアに移行した p210 BCR-ABL は CCCP により誘導されるマイトファジーを抑制すること、それにより蓄積した不良なミトコンドリア由来の ROS が、細胞内の ROS 産生量の増加に寄与すること明らかにした。

以上のことから、p210 BCR-ABL はミトコンドリアへのストレスに応じて、PH ドメイン依存的にミトコンドリアへとその局在性を可逆的に変化させるという、ダイナミックな応答を示すことを明らかにした。また、ミトコンドリアへと移行した p210 BCR-ABL はマイトファジーを阻害すること、その結果蓄積した不良ミトコンドリアより ROS 産生が増強されることを明らかにし、CML における p210 BCR-ABL PH ドメインの病理的な寄与を示唆した。

## 5. 引用文献

1. Cilloni, D. & Saglio, G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* **18**, 930–937 (2012).
2. Daley, G. Q., Van Etten, R. A., & Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824–830 (1990)
3. Deininger, M. W. N. *et al.* The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343–3356 (2000).
4. Clark, S. S. *et al.* Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science* **239**, 775–777 (1988).
5. Pane, F. *et al.* Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A Distinct Disease With a Specific Molecular Marker (BCR/ABL With C3/A2 junction). *Blood* **88**, 2410–2414 (1996).
6. Colicelli, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci. Signal.* **3**, (2011).
7. O'Hare, T., Deininger, M. W. N., Eide, C. A., Clackson, T. & Druker, B. J. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **17**, 212–221 (2011).
8. Woessner, D. W., Lim, C. S. & Deininger, M. W. Development of an Effective Therapy for CML. *Cancer J.* **17**, 1–19 (2011).
9. Zabriskie, M. S. *et al.* BCR-ABL1 Compound Mutations Combining Key Kinase Domain Positions Confer Clinical Resistance to Ponatinib in Ph Chromosome-Positive Leukemia. *Cancer Cell* **26**, 428–442 (2014).
10. Mahon, F. *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years : the prospective , multicentre Stop Imatinib ( STIM ) trial. *Lancet Oncol.* **11**, 1029–1035 (2010).
11. Corbin, A. S. *et al.* Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *Clin. Investig. (Lond).* **121**, 396–409 (2011).
12. Hamilton, A. *et al.* Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* **119**, 1501–1511 (2012).
13. Zhao, X., Ghaffari, S., Lodish, H., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat. Struct.*

- Biol.* **9**, 117–120 (2002).
14. Bruno, B. J. & Lim, C. S. Inhibition of Bcr-Abl in human leukemic cells with a coiled-coil protein delivered by a leukemia-specific cell-penetrating peptide. *Mol. Pharm.* **12**, 1412–1421 (2015).
  15. Daubon, T. *et al.* Differential motility of p190bcr-abl<sup>-</sup> and p210bcr-abl<sup>-</sup> expressing cells: respective roles of Vav and Bcr-Abl GEFs. *Oncogene* **27**, 2673–2685 (2008).
  16. Rochelle, T. *et al.* p210bcr-abl induces amoeboid motility by recruiting ADF/destrin through RhoA/ROCK1. *FASEB J.* **27**, 123–134 (2013).
  17. Basbous, S. *et al.* The Rho-ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukaemia. *J. Pathol.* **240**, 262–268 (2016).
  18. Miroshnychenko, D., Dubrovskaya, A., Maliuta, S., Telegeev, G. & Aspenström, P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions. *Exp. Cell Res.* **316**, 530–542 (2010).
  19. Smith, K. M., Yacobi, R. & Van Etten, R. A. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol. Cell* **12**, 27–37 (2003).
  20. Grebien, F. *et al.* Targeting the SH2-kinase interface in Bcr-Abl inhibits leukemogenesis. *Cell* **147**, 306–319 (2011).
  21. Lamontanara, A. J., Georgeon, S., Tria, G., Svergun, D. I. & Hantschel, O. The SH2 domain of Abl kinases regulates kinase autophosphorylation by controlling activation loop accessibility. *Nat. Commun.* **5**, 5470 (2014).
  22. Dixon, A. S. *et al.* Controlling subcellular localization to alter function: Sending oncogenic Bcr-Abl to the nucleus causes apoptosis. *J. Control. Release* **140**, 245–249 (2009).
  23. McWhirter, J. R. & Wang, J. Y. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.* **12**, 1533–46 (1993).
  24. Hantschel, O. *et al.* Structural basis for the cytoskeletal association of Bcr-Abl/c-Abl. *Mol. Cell* **19**, 461–473 (2005).
  25. Lemmon, M. A. & Ferguson, K. M. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* **350**, 1–18 (2000).
  26. Lemmon, M. A. Pleckstrin Homology (PH) Domains and Phosphoinositides. *Biochem Soc Symp* **93**, 81–93 (2007).
  27. Funamoto, S., Milan, K., Meili, R. & Firtel, R. A. Role of Phosphatidylinositol

- 3' Kinase and a Downstream Pleckstrin Homology Domain-Containing Protein in Controlling Chemotaxis in Dictyostelium. *J. Cell Biol.* **153**, 795–810 (2001).
28. Uchida, Y. *et al.* Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 15846–15851 (2011).
29. Stahelin, R. V., Scott, J. L. & Frick, C. T. Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem. Phys. Lipids* **182**, 3–18 (2014).
30. Ou, W.-J., Ito, A., Umeda, M., Inoue, K. & Omura, T. Specific Binding of Mitochondrial Protein Precursors to Liposomes Containing Cardiolipin. *J Biochem* **103**, 589–595 (1988).
31. Hanada, K. *et al.* Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803–809 (2003).
32. Levine, T. P. & Munro, S. Targeting of Golgi-specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both Ptdlns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Curr. Biol.* **12**, 695–704 (2002).
33. Sugiki, T. *et al.* Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT). *J. Biol. Chem.* **287**, 33706–33718 (2012).
34. DiNitto, J. P. & Lambright, D. G. Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 850–867 (2006).
35. Sano, E. *et al.* Novel tyrosine phosphorylated and cardiolipin-binding protein CLPABP functions as mitochondrial RNA granule. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1036–1047 (2008).
36. Bustillo-Zabalbeitia, I. *et al.* Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of dynamin-related protein 1. *PLoS One* **9**, e102738 (2014).
37. Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**, 1197–1205 (2013).
38. Gonzalez, F. *et al.* Mechanistic issues of the interaction of the hairpin-forming domain of tBid with mitochondrial cardiolipin. *PLoS One* **5**, e9342 (2010).
39. Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B. & Schlessinger, J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated

- pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10472–10476 (1995).
40. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Alex, T. Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665–668 (1997).
  41. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037–1046 (1995).
  42. Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R. & Van Aalten, D. M. F. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase B/Akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr. Biol.* **12**, 1256–1262 (2002).
  43. Li, X.-X., Tsoi, B., Li, Y.-F., Kurihara, H. & He, R.-R. Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* **63**, 301–11 (2015).
  44. Wetzler, M. *et al.* Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.* **92**, 1925–1939 (1993).
  45. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503–2518 (2004).
  46. Colecchia, D. *et al.* MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy* **11**, 1790–1802 (2015).
  47. Barth, S., Glick, D. & Macleod, K. F. Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* **221**, 117–24 (2010).
  48. Li, N. *et al.* A systematic assessment of mitochondrial function identified novel signatures for drug-induced mitochondrial disruption in cells. *Toxicol. Sci.* **142**, 261–273 (2014).
  49. Bin-Umer, M. A., McLaughlin, J. E., Butterly, M. S., McCormick, S. & Tumer, N. E. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 11798–11803 (2014).
  50. Kagan, V. E. *et al.* NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy. *Cell Death Differ.* **23**, 1140–1151 (2016).
  51. Dubash, A. D. *et al.* The GEF Bcr activates RhoA/MAL signaling to promote

- keratinocyte differentiation via desmoglein-1. *J. Cell Biol.* **202**, 653–666 (2013).
52. Park, A.-R. *et al.* Regulation of dendritic arborization by BCR Rac1 GTPase-activating protein, a substrate of PTPRT. *J. Cell Sci.* **125**, 4518–31 (2012).
  53. Narayanan, A. S., Reyes, S. B., Um, K., McCarty, J. H. & Tolia, K. F. The Rac-GAP Bcr is a novel regulator of the Par complex that controls cell polarity. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3857–68 (2013).
  54. Klionsky, D. J. & Schulman, B. A. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive, ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 336–345 (2014).
  55. Li, X. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 1–19 (2013).
  56. Sánchez -Sánchez, B. *et al.* NADPH Oxidases as Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4014–4025 (2014).
  57. Nieborowska-skorska, M. *et al.* Rac2-MRC-cIII – generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* **119**, 4253–4263 (2012).
  58. Ito, K. *et al.* Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* **354**, 1156–1160 (2016).
  59. Ho, T. T. *et al.* Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* **543**, 205–210 (2017).
  60. Capala, M. E., Pruis, M., Vellenga, E. & Schuringa, J. J. Deletion of SAM50 specifically targets BCR-ABL-expressing leukemic stem and progenitor cells by interfering with mitochondrial functions. *Stem cel. dev.* **25**, 427–437 (2016).
  61. Elodie, M. K. *et al.* Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Med.* **23**, 1234–1240 (2017).
  62. Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M. & Hashimoto, Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: Design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5820–5826 (2010).
  63. Demizu, Y. *et al.* Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **26**, 4865–4869 (2016).



## 6. 謝辞

博士学位論文および本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました同志社大学大学院生命医科学研究科・西川 喜代孝教授に感謝致します。

本研究に対する貴重なご助言ならびにご指導いただきました同志社大学大学院生命医科学研究科・高橋 美帆助教に御礼申し上げます。本研究遂行にあたり多大なご協力を頂いた国立医薬品食品衛生研究所・内藤 幹彦博士ならびに、柴田 識人博士に心より感謝致します。p210 BCR-ABL の病理的機能解析の際には、東京女子医科大学医学部・丸 義朗教授、ならびに塚原 富士子講師にご協力頂きましたこと、心より御礼申し上げます。p210 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性解析においては京都大学大学院工学研究科・梅田 真郷教授、ならびに同志社大学大学院生命医科学研究科・舟本 聡准教授に多大なるご協力を頂きましたこと、御礼申し上げます。CERT PH ドメインに関してご教授頂いた国立感染症研究所・花田 賢太郎博士、ならびに熊谷 圭吾博士には心より感謝の意を表します。細胞内 ROS 産生の測定の際には、同志社大学大学院生命医科学研究科・野口 範子教授、ならびに斎藤 芳郎准教授にご協力頂きましたこと、誠に感謝致します。また CL の機能に関してご指導、ご鞭撻頂いた、いわき明星大学薬学部・中川 靖一博士ならびに、北里大学薬学部・今井 浩孝教授に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、アドバイスや励ましの言葉を下さった方々、様々な形でご協力を頂いた分子生命化学研究室のメンバーや技術員の方々に感謝致します。

最後に、優しく見守ってくれた方々や家族に心より感謝致します。