



Title	蛍光タンパク質を用いたイメージング技術によるシグナル伝達の時空間的制御に関する研究
Author(s)	柏木, 彩花
Description	配架番号 : 2515
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14035号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14035
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77845
Type	doctoral thesis
File Information	Sayaka_Kashiwagi.pdf



学位論文

蛍光タンパク質を用いたイメージング技術による

シグナル伝達の時空間的制御に関する研究

(Studies on spatiotemporal regulation of signal transduction

with the use of fluorescence imaging)

2020 年 3 月

北海道大学

柏木彩花

学位論文

蛍光タンパク質を用いたイメージング技術による

シグナル伝達の時空間的制御に関する研究

(Studies on spatiotemporal regulation of signal transduction

with the use of fluorescence imaging)

2020 年 3 月

北海道大学

柏木彩花

【目次】

【発表論文目録および学会発表目録】	1
【要旨】	2
【略語表】	6
【緒言】	9
第1章：シグナル伝達の時空間的制御機構の解析に資するオルガネラマーカの作製	12
【緒言】	12
【実験方法】	15
【実験結果】	24
【考察】	44
第2章：BCR-ABL のシグナル伝達における時空間的制御機構の解明	49
【緒言】	49
【実験方法】	52
【実験結果】	58
【考察】	75
【総括および結論】	78
【謝辞】	80
【利益相反】	81
【引用文献】	82

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kashiwagi Sayaka, Yoichiro Fujioka, Aya Satoh, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Prabha Nepal, Atsushi Tsuzuki, Ozora Aoki, Paudel Sarad, Hitoshi Sasajima, Ohba Yusuke.
Folding latency of fluorescent proteins affects the mitochondrial localization of fusion proteins
Cell Structure and Function, 44, 183-194, 2019
2. Kashiwagi Sayaka, Yoichiro Fujioka, Takeshi Kondo, Aya Satoh, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Hitoshi Sasajima, Amano Maho, Teshima Takanori, Ohba Yusuke.
Localization of BCR-ABL to stress granules contributes to its oncogenic function
Cell Structure and Function, 44, 195-204, 2019

本研究の一部は以下の学会に発表した。

柏木 彩花, 藤岡 容一郎, 佐藤 絢, ネパール プラバ, 続木 惇, 青木 大空, 藤岡 真理, 吉田 藍子, パウデル サラド, 笹島 仁, 大場 雄介.

“Fast maturation of fluorescent proteins inhibits the intrinsic localization of organelle markers”

第 19 回日本蛋白質科学会年会、第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会、2019 年 6 月 24 日～2019 年 6 月 26 日、神戸コンベンションセンター、兵庫

【要旨】

背景と目的

細胞内シグナル伝達は、細胞が外部の環境変化に対し適応するための分子機構である。細胞はシグナル伝達分子の活性化を時間的、空間的に制御することで、複雑なネットワークを形成するシグナル経路を使い分け、多彩な生理機能を発揮する。その一例として、シグナル伝達分子はどのオルガネラに局在するかにより、異なる下流因子を活性化することが知られている。すなわち、シグナル伝達の時空間的制御には細胞内オルガネラが関与している。シグナル伝達分子やオルガネラの時空間的動態を理解するためには、蛍光タンパク質を用いた生細胞イメージングおよび定量的画像解析が有力なツールとなる。慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) の病因となるキメラタンパク質 BCR-ABL はチロシンキナーゼ活性を有し、種々のシグナル伝達経路活性化を制御するシグナル伝達分子である。当研究室では以前に、BCR-ABL の活性を生細胞で定量可能なバイオセンサーを開発し、その過程で BCR-ABL が細胞内で顆粒状構造に局在することを見出した。そこで、本研究ではシグナル伝達分子の時空間的動態解析に資するオルガネラ局在性の蛍光タンパク質 (オルガネラマーカー) の作製と検証を行い、それらを用いて BCR-ABL シグナル伝達の時空間的制御機構の解明を目指した。

材料と方法

第1章: ミトコンドリア、エンドソーム、小胞体、ゴルジ装置、アクチン線維、微小管、形質膜、核等 12 種類のオルガネラ局在タンパク質および局在配列と群青色から近赤外まで 6 種類の蛍光タンパク質を用い、すべての組み合わせでオルガネラマーカーを作製した。オルガネラマーカーを哺乳類細胞に発現させ、蛍光顕微鏡下でその局在を観察した。ミトコンドリア領域の抽出には画像解析ソフト ImageJ を、蛍光強度の定量には画像解析ソフト MetaMorph®を用いた。蛍光タンパク質のアミノ酸配列を多重配列アライメントにより比較した。蛍光タンパク質コード配列への点変異導入はポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) で行った。第2章: BCR-ABL の局在は免疫蛍光染色、もしくは蛍光タンパク質との融合タンパク質発現によって可視化した。BCR-ABL のトランケーション変異体は PCR を用いて作製した。全長もしくはトランケーション変異体の BCR-ABL の形質転換能は、それらを安定発現するマウス pro-B 細胞

株 Ba/F3 細胞を樹立し、IL-3 不含培地における増殖能で評価した。

結果

第 1 章：作製した大部分のオルガネラマーカーは標的オルガネラに局在した。ただしミトコンドリアマトリックスマーカーについては、緑色蛍光タンパク質 enhanced green fluorescent protein (EGFP) を用いたマーカーがミトコンドリアのみに局在したのに対し、EGFP 改変体である Sirius (群青色)、super-enhanced cyan fluorescent protein (SECFP) (シアン色) や Venus (黄色) を用いたものでは、ミトコンドリア以外に細胞質や核にも局在した。これらは全て同じ *Aequorea victoria* 由来の GFP (avGFP) の変異体であるため、さらに他の avGFP 変異体についても同様にミトコンドリアマトリックスマーカーを作製しその局在を観察した。その結果、ミトコンドリアのみに局在するものと、標的以外にも局在するものに分類された。これらの avGFP 変異体のアミノ酸配列を比較したところ、標的以外の局在を示すマーカーに用いられている蛍光タンパク質には、フォールディング効率を上げる変異 (フォールディング変異) が導入されていた。そのうち、pH センサーである superecliptic pHluorin (以下、pHluorin) を用いて、フォールディング変異がマーカーの局在に及ぼす影響を検証した。pHluorin に導入されているフォールディング変異に対して、EGFP と同じアミノ酸になる復帰変異を導入したところ、ミトコンドリアマトリックスマーカーは細胞質や核には局在せず、ミトコンドリアのみに局在した。第 2 章：BCR-ABL は細胞質中に顆粒構造を形成したが、それらはエンドソームやリソソームなど既知の顆粒状オルガネラとは局在が一致しなかった。生細胞イメージングによって BCR-ABL 顆粒の動態を観察したところ、液滴のような振る舞いを示し、RNA とタンパク質からなる RNA 顆粒である可能性が示唆された。実際、RNA 顆粒形成を妨げるタンパク合成阻害薬シクロヘキシミドの添加によって BCR-ABL 顆粒が減少した。次に、BCR-ABL 顆粒が、細胞内 RNA 顆粒として知られているストレス顆粒と processing body (P-body) のどちらであるかを検証した。BCR-ABL 顆粒の数は、小胞体ストレスを介してストレス顆粒の形成を誘導する Ca^{2+} -ATPase 阻害薬タプシガルギンの添加によって増加した。また、BCR-ABL 顆粒は P-body の構成要素であるメッセンジャー RNA デキャッピング酵素 Dcp1a とは共局在せず、ストレス顆粒の構成要素である heat shock protein 90 α (Hsp90 α) と共局在した。以上の結果から、BCR-ABL 顆粒はストレス顆粒で

あることが示された。さらに、BCR-ABL キナーゼ活性の阻害や、N 末端領域の欠損によって BCR-ABL の顆粒形成は抑制された。最後に、BCR-ABL の顆粒形成と造腫瘍能の関連を検証するために、Ba/F3 細胞を用いた増殖アッセイを行った。Ba/F3 細胞は IL-3 依存性に増殖し、IL-3 非存在下では数日のうちに死滅する。一方、IL-3 非存在下でも BCR-ABL 等の活性型チロシンキナーゼを発現させるとキナーゼ活性に依存して増殖することが知られている。全長の BCR-ABL を Ba/F3 細胞に安定発現させると IL-3 非存在下でも増殖したが、N 末端欠損により顆粒形成能を喪失した変異型 BCR-ABL の発現では、IL-3 非依存性の細胞増殖は誘導されなかった。

考察

第 1 章：pHluorin のフォールディング効率が EGFP と同等になるように復帰変異を導入した結果、ミトコンドリアマトリックスマーカのミスローカラーゼーションが抑制された。そのメカニズムとしては、フォールディング変異の導入された蛍光タンパク質はミトコンドリアに輸送される前にフォールドしてしまい、ミトコンドリア外膜もしくは内膜のポアタンパク質を通過できなくなることが考えられる。これまでフォールディング変異は蛍光イメージングにおいてメリットをもたらすため積極的に導入されてきたが、用途によっては融合タンパク質の機能を阻害することが明らかとなり、導入するか否か慎重に検討する必要があることが分かった。第 2 章：BCR-ABL は細胞質中にストレス顆粒を形成し、その形成には BCR-ABL キナーゼ活性および、N 末端ドメインを必要とした。形成メカニズムとしては、BCR-ABL 自身ないし下流因子群が凝集し、原形質との液-液相分離が生じたと考えられる。さらに、BCR-ABL の顆粒形成は Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性の増殖能獲得に関与したことから、顆粒構造にシグナル伝達分子が集中するため効率よくシグナルが伝達される、あるいはがん抑制遺伝子の mRNA を顆粒内に隔離することでその転写を抑制するなどの仮説が考えられた。今後は BCR-ABL による顆粒形成のメカニズムや、造腫瘍能への関与をより詳細に検証し、相分離の解消を標的とした新しいアプローチによる CML 治療開発へと展開したい。

結論

第 1 章：各種オルガネラを多色で標識するオルガネラマーカを作製した。ミ

トコンドリアマトリックスマーカーにおいては、蛍光タンパク質に対するフォールディング変異の導入が細胞質や核へのミスローカライゼーションを誘発した。第2章：BCR-ABLは細胞質中にストレス顆粒を形成した。BCR-ABLによる顆粒形成はABLキナーゼ活性およびBCRのN末端領域に依存し、増殖能の獲得に関与した。

【略語表】

ANOVA:	analysis of variance
<i>at:</i>	<i>“a tempo”</i>
ATP:	adenosine triphosphate
avGFP:	<i>Aequorea victoria</i> GFP
BCR:	breakpoint cluster region
BiFC:	bimolecular fluorescence complementation
BRCA1:	breast cancer susceptibility gene 1
BSA:	bovine serum albumin
cAMP:	cyclic AMP
CC:	coiled-coil
CCD:	charge-coupled device
CD:	clusters of differentiation
CHX:	cycloheximide
CML:	chronic myelogenous leukemia
CMV:	cytomegalovirus
DIC:	differential interference contrast
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT:	dithiothreitol
Dvl2:	Dishevelled 2
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1:	early endosome antigen 1
EGFP:	enhanced green fluorescent protein
EMCCD:	electro multiplying charge-coupled device
ER:	endoplasmic reticulum
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
FBS:	fetal bovine serum
FCCP:	p-trifluoromethoxyphenylhydrazine
FRET:	Förster resonance energy transfer

FYVE: Fab 1, YOTB, Vac 1, EEA1
 GalT: β 1,4-galactose transferase
 GFP: green fluorescent protein
 Grb2: growth factor receptor-bound protein 2
 HSD: honestly significant difference
 Hsp90: heat shock protein 90
 IDR: intrinsically disordered region
 IL-3: Interleukin-3
 LAMP1: Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
 LB: Lysogeny Broth
 MANOVA: multivariate analysis of variance
 MEM: Minimum Essential Medium Eagle
 MTS: mitochondria-targeting sequence
 MVB: multivesicular body
 NPM-ALK: nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase
 OSER: organized smooth ER
 P-body: processing body
 PBS: phosphate buffered saline
 PBT: phosphate buffered saline with Tween 20[®]
 PCR: polymerase chain reaction
 PFA: paraformaldehyde
 Ph¹: Philadelphia
 PI3K: phosphoinositide 3-kinase
 Pickles: phosphorylation indicator of CrkL *en* substrate
 PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
 PVDF: polyvinylidene difluoride
 RalGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
 RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640
 SECFP: super-enhanced cyan fluorescent protein
 SEM: standard error of the meansfGFP: superfolder GFP

SH: Src homology

SOC: super optimal broth with catabolite repression

TBS-T: Tris-buffered saline with Tween 20[®]

TG: thapsigargin

TIM: translocase of inner membrane

TMEM192: transmembrane protein 192

TMRM: tetramethylrhodamine ethyl ester (perchlorate)

TNG: Tris-NaCl-glycerol

TOM: translocase of outer membrane

TrkA: tropomyosin receptor kinase A

【緒言】

細胞内シグナル伝達は、細胞が外部環境の変化に適応するための分子機構である。細胞が外部からのホルモンや増殖因子などといった刺激を受容すると、タンパク質のリン酸化やタンパク質間相互作用などの生化学的反応を介してシグナルを伝達し、最終的に遺伝子発現や細胞増殖等の応答を示す。シグナル伝達において入力から出力に至るまでの経路は単純ではなく、シグナル伝達分子が正にも負にも互いに影響し合う複雑なネットワークを形成している。これにより細胞は外部刺激に対して迅速に、かつ多様で複雑な応答を示すことが可能となる。その反面、細胞が外部環境からの刺激に対して適切に応答するためには、複雑なシグナル伝達のネットワークを状況に応じて制御し、使い分ける必要がある。シグナル伝達の制御に異常が生じると外部環境に対する不適切な応答が起こり、細胞や臓器の異常、ひいては生体レベルでの疾患（がん、免疫疾患など）の発症へと繋がりをうる。

細胞内シグナル伝達を精密に制御するメカニズムの一つとして、シグナル伝達が細胞内の「いつ・どこで」起こるか、すなわちシグナル伝達の時空間的制御があげられる。例えば、神経細胞において神経成長因子受容体 tropomyosin receptor kinase A (TrkA) が細胞膜から一過性のシグナルを発する場合は細胞増殖を促進し、一方でエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソームから持続性のシグナルを発する場合は分化を誘導する (Zhang et al., 2000)。当研究室においても、低分子量 G タンパク質 Ras シグナルの時空間的制御とその生物学的意義を明らかにしている。例えば、Ras シグナルは細胞膜からのみ発せられると考えられており、実際に Ras とその標的因子のうち RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase や Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS) が形成する複合体は細胞膜に局在する。一方、Ras と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の複合体は細胞膜だけではなくエンドソームにも局在した (Fujioka et al., 2011)。また、エンドソームから発せられる Ras-PI3K シグナルがエンドサイトーシスを制御することを報告している (Tsutsumi et al., 2009)。以上のように、細胞内シグナル伝達の時空間的制御において、オルガネラがシグナル伝達のプラットフォームとして重要な役割を担っている。

シグナル伝達の時空間的制御機構を理解するためには、シグナル伝達分子が細胞内においていつ・どこに存在するかを定量的に評価することが重要である。これを可能とする手法の一つが、蛍光色素や蛍光タンパク質を用いた生細胞で

のイメージングである。前述のように、オルガネラはシグナル伝達分子のプラットフォームとして機能するため、シグナル分子とオルガネラの双方を異なる色で蛍光標識することで、シグナル伝達分子の時空間的動態を定量的に解析することができる。当研究室においても、蛍光タンパク質を用いたシグナル伝達分子およびオルガネラの可視化に加え、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET)、蛍光タンパク質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) などの手法を組み合わせ、生細胞におけるシグナル伝達の時空間的制御機構を解析してきた (Fujioka et al., 2011, 2018, 2019; Tsutsumi et al., 2009)。複数の分子動態を同時に観察したり、FRET、BiFC などを取り入れるためには、多色の蛍光タンパク質を用いたイメージングツールの作製が必要であり、またシグナル伝達の時空間的制御機構を研究するためにはオルガネラの正確な標識が必要となる。そこで本研究では細胞内シグナル伝達の時空間的制御機構の解析に資するオルガネラマーカーを作製するとともに、それらを用いた蛍光イメージングによってシグナル伝達の時空間的制御機構を解明することを目的とした。

本博士論文は 2 部で構成される。第 1 章ではさまざまなオルガネラを正確に標識するオルガネラマーカーを作製するため、12 種のオルガネラ局在配列もしくは局在タンパク質と 6 種の蛍光タンパク質のすべての組み合わせでオルガネラマーカーを作製し、哺乳類細胞での局在を観察した。作製した大部分のマーカーは標的オルガネラのみに局在したが、一部の組み合わせで標的オルガネラ以外に局在した。特にミトコンドリアマトリックスマーカーについては、6 種の蛍光タンパク質のうち緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 以外の全ての蛍光タンパク質を用いたマーカーが細胞質や核へミスローカライゼーションした。そこで、正確にミトコンドリアマトリックスに局在するマーカーに改変することを目的として詳細に検証を重ねた。第 2 章では、構築したオルガネラマーカーを用い、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) の原因タンパク質であるチロシンキナーゼ BCR-ABL の細胞内局在を解析した。その結果、BCR-ABL は古典的なオルガネラとは異なり、膜を持たない細胞内顆粒構造 (メンブレンレスオルガネラ) を形成することが判明した。FRET バイオセンサーを用いた生細胞での BCR-ABL 活性評価、免疫蛍光法による内在性 BCR-ABL の局在評価、およびトランケーション変異体作製による顆粒形成責任領域の決定などを行うことで顆粒構造の形成機構を解析し、顆

粒形成には BCR-ABL キナーゼ活性と BCR の N 末端ドメインが必要であることを明らかにした。さらに、顆粒形成できない変異型 BCR-ABL を用いた増殖アッセイにより、顆粒形成が増殖能の獲得に重要であることが示された。

第 1 章：シグナル伝達の時空間的制御機構の解析に資するオルガネラマーカーの作製

【緒言】

真核生物の細胞は、高度に発達したオルガネラを内包し、それぞれのオルガネラは独自の形態と機能を有している。一般的なオルガネラは脂質膜によって細胞質から独立した環境を保ちつつも、その構造は非常に動的であり、様々な細胞内外のシグナルに応じて大きさや数、細胞内局在を変化させる。例えばエンドソームは、細胞が細胞外の物質を取り込むエンドサイトーシスの過程で形成される小胞であり、取り込まれた物質（カーゴ）の選別を行う初期エンドソーム、内容物を分解するリソソームへと輸送する後期エンドソーム、カーゴを再利用するために細胞膜へと輸送するリサイクリングエンドソームに大別される。また、ミトコンドリアは酸化リン酸化によるアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate, ATP）の産生をはじめとして、脂肪酸の β 酸化や熱産生、細胞内カルシウムイオン濃度の調節など多彩な機能を持つ。ミトコンドリアは他のオルガネラとは異なり二重の脂質膜構造を有しているため、核 DNA から転写・翻訳されたミトコンドリアタンパク質がミトコンドリアマトリックス内に局在するためには、外膜の TOM（translocase of outer membrane）複合体および内膜の TIM（translocase of inner membrane）複合体を通過する必要がある (Chacinska et al., 2009)。また、ミトコンドリアは細胞内を活発に移動し、頻繁に融合と分裂を繰り返すことで数や容積、形を変化させ、自身の機能を維持していると考えられている (Archer, 2013; Youle and van der Bliek, 2012)。生細胞イメージングを用いた定量的解析により、ミトコンドリアは G1-S 期において一過性に融合し、巨大なネットワークを形成することで ATP 産生能を亢進させ、S 期への進入を促進することが分かっている (Mitra et al., 2009)。

蛍光タンパク質はオルガネラ動態観察をはじめとする生細胞イメージングを行うための強力なツールである。蛍光タンパク質は蛍光性の発揮に補酵素や基質を必要とせず、コード配列を細胞に遺伝子導入するだけで蛍光性を持つ分子を発現する。mRNA から翻訳されたポリペプチド鎖が三次構造へと折りたたまれ（フォールディング）、分子内のアミノ酸が近接することで、環化、脱水、酸化を経て発色団を形成し、蛍光性を獲得する (Reid and Flynn, 1997)。フォールディングから蛍光性獲得までの一連の流れは（蛍光タンパク質の）成熟と呼ばれる (Nagai et al., 2002)。この成熟過程は自己触媒的に起こるため、特別な操作な

しに蛍光タンパク質は蛍光を発するようになるのである。オワンクラゲ *Aequorea victoria* から緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) が発見されて以来(Shimomura et al., 1962)、造礁サンゴ *Discosoma* sp.から単離された赤色蛍光タンパク質 DsRed を始めとしてオワンクラゲ以外の生物種からも蛍光タンパク質が同定された。さらに野生型の蛍光タンパク質をもとに、遺伝子工学的手法によって励起/蛍光波長(Heim et al., 1994; Ormö et al., 1996)や量子効率(Bajar et al., 2016; Heim et al., 1995)、37°Cにおけるフォールディング効率(Nagai et al., 2002; Pédelacq et al., 2006)、光安定性(Griesbeck et al., 2001; Lam et al., 2012; Mena et al., 2006)などを改変した様々な変異体が作製されてきた。また、蛍光タンパク質は蛍光強度や励起/蛍光波長が環境中のイオン濃度、酸化還元状態によって変化する特徴を持ち、これらの特徴を利用して細胞内環境をモニターする蛍光タンパク質も創出されている。代表的なバイオセンサーとしては細胞内のpH変化幅に反応し、酸性環境で蛍光強度が低下するpHluorinや、酸化還元状態によって蛍光特性が変化し、還元状態では励起波長が405 nm から488 nm に変わる roGFP2 などが挙げられる(Hanson et al., 2004; Sankaranarayanan et al., 2000)。こういった蛍光タンパク質の物理化学的性質を利用したバイオセンサーにより、一細胞内の分子から一個体内の細胞に至るまでの動態や機能を比較的容易に解析できるようになってきた。

蛍光タンパク質は生物学や医学をはじめとして幅広い領域で用いられる研究ツールとなったが、あらゆる用途や状況において万能な蛍光タンパク質は存在しない。このため、利用の際には蛍光タンパク質の性質を理解し、発現させる細胞や個体に予期せぬ二次的な影響が出る可能性を常に考慮しなければならない。その一例が、蛍光タンパク質にオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列を融合させたオルガネラマーカである。オルガネラマーカは細胞に発現させて任意のオルガネラを標識する目的で広く用いられており、標的オルガネラの形態や細胞内局在、機能などの変化を経時的に捉えることを可能とする(Chudakov et al., 2010; Rizzuto et al., 1995; Takeuchi and Ozawa, 2007)。例えば、オルガネラマーカを用いてエンドソームの細胞内動態を解析することにより、初期エンドソームが移動速度や滞留時間によって二つの群に分類されること、さらにそれらの違いによってカーゴの辿る運命が異なることが明らかとなった(Lakadamyali et al., 2006)。しかし、オルガネラマーカは予想とは異なる局在(ミスローカライゼーション)を示すことがある。その原因は、用いたオ

ルガネラ局在タンパク質あるいは蛍光タンパク質が有する物理化学的性質に起因する。実際に、ミスローカライゼーションにより観察結果が誤って解釈された例が報告されている。ミトコンドリア局在配列で標識した cyclic AMP (cAMP) バイオセンサーがミトコンドリアだけでなく細胞質にも局在したことにより、細胞質での cAMP 濃度上昇を誤ってミトコンドリア cAMP 濃度上昇として解釈された事例があった(DiPilato et al., 2004)。それに対し、ミトコンドリア局在配列のコピー数を増やし、かつ融合させる蛍光タンパク質の検討によりミトコンドリアのみに局在させたオルガネラマーカ―では、上記のような現象を観察することはできなかった(Di Benedetto et al., 2013)。また、オルガネラマーカ―の過剰発現がオルガネラの形態に影響を及ぼす事例も報告されている。例えば小胞体マーカ―の場合、多量体を形成する蛍光タンパク質を用いることで滑面小胞体の膜が互いに折り重なって接着し、異常な構造を形成することが知られている(Snapp et al., 2003)。したがって、オルガネラマーカ―を作製する際には、その細胞内局在、および発現によるオルガネラの形態の変化等を慎重に評価することが非常に重要である。

そこで本研究では、シグナル伝達の時空間的制御を生きた細胞で解析するためのオルガネラマーカ―群を作製することを目的とした。12 種のオルガネラ局在配列および局在タンパク質と 6 種の蛍光タンパク質すべての組み合わせからなるオルガネラマーカ―を作製したところ、大部分の組み合わせで目的のオルガネラが正しく標識されることが確かめられた。一方、ミトコンドリアマトリックスマーカ―では一部の組み合わせで細胞質や核へのミスローカライゼーションが認められ、その原因が蛍光タンパク質に導入されたフォールディング効率を上げる変異であることを見出した。さらに、それらの変異を野生型 EGFP と同じアミノ酸に戻す復帰変異を導入すると、ミトコンドリアマトリックスマーカ―のミスローカライゼーションは明らかに抑制された。

【実験方法】

細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 human embryonic kidney (HEK)293T (CRL011268)、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa (CCL-2)、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞株 Cos-1 (CRL-1650)、ヒト有棘細胞癌由来細胞株 A431 (CRL-1555)、ヒト肺癌由来細胞株 A549 (CCL-185)、イヌ由来腎臓尿細管上皮細胞株 MDCK (CCL-34) は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。これらの細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) と 1% ペニシリンーストレプトマイシン (富士フイルム和光純薬、大阪) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose, DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い、37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。

遺伝子導入

細胞への遺伝子導入にはポリエチレンイミン (PEI Max 40K, Polyscience, Warrington, PA, USA) を用いた。OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific) 250 μ l に精製プラスミドと 2 μ l のポリエチレンイミンを加えて vortex を行い、室温で 5 分間静置した後細胞培養液中加入した。CO₂ インキュベーターで 6 時間培養後に培養液を交換した。

プラスミド構築

mPlum-Lifeact-7 (#54679) および mCherry-Sec61 β (#49155) は Addgene (Watertown, MA, USA) から購入した。EGFP-Rab5 および EGFP-Rab7 の発現ベクターは当教室において以前に坪井貴司先生 (東京大学) から譲渡されたものを使用した (Fujioka et al., 2011)。EGFP の発現ベクターは当教室において以前に作製されたものを使用した。各オルガネラ局在配列および蛍光タンパク質のコード配列は後述のプライマーの項に記載したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) で増幅した。オルガネラ局在配列のコード配列は *Xho*I と *Not*I で切り出し、ヒトサイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV) プロモーターをもつ pFX-SECFP ベクター (Fujioka et al., 2018) の *Xho*I/*Not*I サイトにサブクローニングして pFX-mito-SECFP、pFX-Tom20-SECFP、pFX-SECFP-Rab5、pFX-SECFP-Rab7、pFX-SECFP-Rab11、pFX-SECFP-Sec61 β 、pFX-SECFP-Lifeact、pFX-Golgi-SECFP、pFX-Tubulin-SECFP、pFX-H2B-SECFP を得た。上記のプラスミドの *Eco*RI/*Bgl*II、

EcoRI/XhoI, ないし *NodI/BglII* サイトに蛍光タンパク質 (Sirius, EGFP, Venus, mCherry, および iRFP713) のコード配列をサブクローニングし、カラーバリエーションを作製した。さらにミトコンドリアマトリックスマーカについては、*EcoRI/BglII* サイトに蛍光タンパク質 (MiCy, mKate2, eqFP650, pHluorin, および sfGFP) のコード配列をサブクローニングし、pFX-mito-MiCy, pFX-mito-mKate2, pFX-mito-eqFP650, pFX-mito-pHluorin, pFX-mito-sfGFP を得た。AcGFP1 のコード配列は後述のプライマー AcGFP_F と AcGFP_R を用いて PCR で増幅し、pDsRed2-Mito (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, USA) の *AgeI/NodI* サイトにサブクローニングし、pCMV-mito-AcGFP1 を得た。ミトコンドリア局在配列 (mitochondria-targeting sequence, MTS) として、cytochrome c oxidase subunit VIII の MTS を蛍光タンパク質の N 末端に融合させた (De Michele et al., 2014)。

pHluorin の変異体 (pHluorin V163, pHluorin S175 および pHluorin V163/S175) のコード配列は *EcoRI/BglII* で切り出し、pFX-mito-mCherry の *EcoRI/BglII* サイトにサブクローニングして pFX-mito-pHluorin V163, pFX-mito-pHluorin S175, pFX-mito-pHluorin V163/S175 を得た。また、上記の pHluorin 変異体と pHluorin のコード配列を *EcoRI/BglII* で切り出し、pFX-mCherry の *EcoRI/BglII* サイトにサブクローニングして pFX-pHluorin, pFX-pHluorin V163, pFX-pHluorin S175, pFX-pHluorin V163/S175 を得た。

pFX-mito-EGFP, pFX-mito-pHluorin, pFX-mito-pHluorin V163, pFX-mito-pHluorin S175, および pFX-mito-pHluorin V163/S175 は *BglII* で切断し、pGEX-4T3 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) は *NodI* で切断した後に DNA polymerase I, large (Klenow) fragment (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で平滑末端を形成した。続いて pFX-mito ベクターは *XhoI*, pGEX ベクターは *SacI* で切断し、両者をライゲーションして大腸菌発現ベクター pGEX-mito-EGFP, pGEX-mito-pHluorin, pGEX-mito-pHluorin V163, pGEX-mito-pHluorin S175, pGEX-mito-pHluorin V163/S175 を得た。

上記のプラスミドのうち細胞に遺伝子導入するものは、形質転換した大腸菌を 100 ml の Lysogeny Broth (LB) 液体培地を用いて一晩 37°C で振盪培養したのち NucleoBond Xtra Midi EF (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) を用いて midi prep を行い、精製した。

プライマー

本研究で使したプライマーを表 1 に示す。

表 1. 使したプライマーリスト

No Experiment	Primer name	Sequence (5' to 3')
1 Color pallet	mito_F	GGCTCGAGATGTCCGTCTGACGCCGC
2 Color pallet	mito_R	CCGCGGCCCGCAGGTGGCGACCGGTGGATC
3 Color pallet	Tom20_F	GGCTCGAGCCCGCCATGGTGGGTCGGAACAGCGC
4 Color pallet	Tom20_R	GGGCGGCCCGCCTTCCACATCATCTTCAGCCAA
5 Color pallet	EEA1_F	GGCTCGAGCCCAACATGTTAAGGAGGATTTTACAG
6 Color pallet	EEA1_R	GGGCGGCCCGCCTCCTTGCAAGTCATTGAAAC
7 Color pallet	Rab11_F	CTCGAGGCCACCATGGGCACCCGCGACGACGAG
8 Color pallet	Rab11_R	GCGGCCGCTTAGATGTTCTGACAGCACTG
9 Color pallet	Sec61_F	GGCTCGAGCCCAACATGCCTGGTCCGACCCCCAG
10 Color pallet	Sec61_R	GGGCGGCCCGCCCGAACGAGTGTACTTGCCCC
11 Color pallet	Lifeact_F	GGCTCGAGGCCACCATGGGCGTGGCCGACTTGATC
12 Color pallet	Lifeact_R	GGGATCCACCGGTGGCTACCGCGGCCGCAA
13 Color pallet	Golgi_F	CTCGAGGCCACCATGAGGCTTCGGGAGCCG
14 Color pallet	Golgi_R	GCGGCCGCGAGGCCCTCCGGTCCGGAG
15 Color pallet	Tubulin_F	ATCTCGAGACCACCATGAGGGAAATCGTGCACTTGCGAG
16 Color pallet	Tubulin_R	TAGCGGCCCGCAGGCCACCTCCTCCTCAGCCTC
17 Color pallet	H2B_F	TATCTCGAGATGCCAGAGCCAGCGAA
18 Color pallet	H2B_R	ACAGCGGCCGCTCTTAGCGCTGGTGTACTTG
19 Color pallet	SDHB_F	TTCTCGAGTTCACCATGGCGGCGGTGGTCGC
20 Color pallet	SDHB_R	AAGCGGCCGCGAACTGAAGCTTTCTTCTCCTTATAGG
21 Color pallet	UQCR11_F	AACTCGAGTTCACCATGGTGACCCGTTCTCTGGG
22 Color pallet	UQCR11_R	AAGCGGCCGCGATTATCCTTCTTAAACTTGCCATTG
23 Color pallet	EGFP_F	AAGAATTACCATGGTGAGCAAGGGCGAG
24 Color pallet	CFP_R	GGCTCGAGAGATCTCTTGACAGCTCGTCCATGC
25 Color pallet	mCherry_F	AAGAATTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
26 Color pallet	mCherry_R	TTAGATCTTCTCCGAGCCTCCCTTGACAGCTCGTCCATGC
27 Color pallet	iRFP_F	GAATTCCACCATGGCCGAAGGGAGCGTGGC
28 Color pallet	iRFP_R	CTCGAGTTCCTCCATCACGCCAATCT
29 mito-FPs	MiCy_F	TTGAATTCGGCACCATGGTGTCTTATTCAAAGCA
30 mito-FPs	MiCy_R	CCAGATCTTTTAACCTTCAAAGGGTTAAC
31 mito-FPs	mKate2_F	GAATTCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAA
32 mito-FPs	mKate2_R	GGAGATCTTCTGAGTCCGGAACCTCCTC
33 mito-FPs	TFP650_F	AAGAATTCATGGGAGAGGATAGCGAG
34 mito-FPs	TFP650_R	TTAGATCTGCTGTGCCCCAGTTTG
35 mito-FPs	pHluorin_F	AAGAATTCAACACCATGAGTAAAGGAGAAG
36 mito-FPs	pHluorin_R	TTAGATCTTTTGATAGTTCATCCATGCC
37 mito-FPs	sfGFP_F	ACGAATTCAACACCATGGTGAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC
38 mito-FPs	sfGFP_R	TTAGATCTTTTGATAGCTCATCCATGC
39 mito-FPs	AcGFP_F	CCACCGGTCGCCACCATGGCCACAACCATGGTGAG
40 mito-FPs	AcGFP_R	TTGCGGCCGCTACTTGACAGCTCATCCATGC
41 at pHluorin	A163V_F	GAATGGAATCAAAGTGAAGTTCAAAATTAGAC
42 at pHluorin	G175S_F	GAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAG

部位特異的変異導入 (site-directed mutagenesis)

pHluorin 配列において、タンパク質のフォールディング効率を上げる目的で導入された二箇所の遺伝子変異 (V163A/S175G) を野生型 GFP と同様の V163/S175 に置換するために部位特異的変異導入を行った。上記の目的で設計されたプライマー (#41、#42) と KOD-Plus-Neo (東洋紡、大阪) を用い、pCR-BluntII-TOPO-pHluorin を鋳型プラスミドとしてプラスミド全長を増幅し、PCR 反応後 *DpnI* (ロシュ・ダイアグノスティックス、東京) を加えて 37°C で 2 時間処理した。*DpnI* は塩基配列が GATC であり、かつアデニンがメチル化されている場合にのみ切断するため、*dam*⁺株である JM109 株によって増幅された鋳型プラスミドのみを切断し、PCR 産物は消化されない。その後 1.5 μ l の 5 M NaCl と 100 μ l のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い、滅菌蒸留水に再懸濁後、T4 Poly Nucleotide kinase (東洋紡) と DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ、草津) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。コンピテントセル (100 μ l) を加えて形質転換したのち、Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) 培地を加えて 37°C で 1 時間振盪培養し、カナマイシン含有 LB プレート上で一晩培養した。得られたコロニーをカナマイシン含有 LB 液体培地中で振盪培養し、FastGene™ プラスミドミニキット (日本ジェネティクス、東京) を用いて精製し、pCR-BluntII-TOPO-pHluorin V163、pCR-BluntII-TOPO-pHluorin S175 および pCR-BluntII-TOPO-pHluorin V163/S175 を得た。なお、これらのプラスミドはシーケンス解析によって変異が正しく導入されていることを確認した。

固定細胞におけるオルガネラマーカの局在観察

1 mM 塩酸で希釈した 10% コラーゲン (新田ゼラチン、八尾) で処理し、コラーゲンコートした 96 well ガラス底プレート (AGC テクノグラス、榛原郡吉田町) に 3.0×10^3 個の Cos-1 細胞もしくは HeLa 細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。各種オルガネラマーカ 0.5 μ g を 1 well につき 1 種類ずつ遺伝子導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで一晩培養した。37°C に加温したリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) で洗浄した後、3% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) を加えて室温で 15 分間インキュベートし、細胞を固定した。細胞の観察には、倒立型リサーチ顕微鏡 IX-83 (オリンパス、東京) および開口数 1.35 の 60 倍油浸対物レンズ (オリンパス) を使用し、検出器として冷却 electro multiplying charge-coupled device (EMCCD) カメラ

Rolera EM-C² (QImaging, Surrey, BC, Canada)、励起光源として SOLA Light Engine (Lumencor, Beaverton, OR, USA) を使い、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) で顕微鏡および周辺機器を制御した。フィルターセットは表 2 に示すものを用いた。

生細胞におけるミトコンドリアマトリックスマーカの局在観察および定量

コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュ (AGC テクノグラス) に 3.0×10^4 個の Cos-1 細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。ミトコンドリアマトリックスマーカ発現プラスミドベクター 1.0 μ g を遺伝子導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで一晩培養した。その後培地をサクションにより除き、終濃度 125 nM になるように MitoTracker Red CMXRos もしくは MitoTracker Green FM を 100 μ l の DMEM に添加し、細胞に加えて 37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分培養した。37°C に加温した PBS で洗浄した後、1 ml の DMEM/F12 培地に置換し観察を行った。細胞の観察には、共焦点ユニットとして sDISK spinning disk unit (Andor Technology, Belfast, UK) を装着した倒立型リサーチ顕微鏡 IX-83 (オリンパス) および開口数 1.35 の 60 倍油浸対物レンズ (オリンパス) を使用した。サンプル周囲環境は Chamlide インキュベーターシステム (Live Cell Instrument, Seoul, South Korea) を用いて 37°C に保温した。フィルターセットは表 2 に示すものを用いた。共焦点撮像の際、励起光源として 405、488、561 および 633 nm のレーザーモジュール (Spectral Applied Research, Hamilton, ON, Canada) を用いた。mito-Sirius を含む観察実験においては一体型の共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i (オリンパス) を用いて観察を行った。

細胞種間での比較を除く定量実験では、ミトコンドリアに局在しないネガティブコントロールとして蛍光タンパク質発現プラスミドベクター 1.0 μ g を遺伝子導入したサンプルを用意した。また、すべての定量実験において細胞の領域を決定するために微分干渉 (differential interference contrast, DIC) 像を撮像した。

ミトコンドリアの二値化画像は過去に報告された手法 (Iannetti et al., 2016) を参考に、MitoTracker の画像から作製した。まず、ImageJ ソフトウェアを用いて “rolling ball” アルゴリズムによるバックグラウンドの減算を行い、メキシカンハットフィルターによりシグナルを抽出し、メディアンフィルターによりノイズの除去を行った。その後 ImageJ のプラグイン “Auto Threshold” と “Remove Outliers” を使い、ミトコンドリアの二値化画像を得た。

ミトコンドリアマトリックスマーカおよび蛍光タンパク質の蛍光画像にお

いて、ミトコンドリアの二値化画像をマスク画像として蛍光強度を測定し、ミトコンドリアの蛍光強度とした。また DIC 像から細胞の領域を決定し、細胞全体の蛍光強度も同時に測定した。細胞全体の蛍光強度に対するミトコンドリアの蛍光強度の比を取り、ミトコンドリアマトリックスマーカーおよび蛍光タンパク質のミトコンドリアへの局在を定量化した。

表 2. 使用したフィルターセット

フィルターセット	蛍光タンパク質、蛍光色素
FF01-387/11-25, FF02-447/60-25 (Semrock, Rochester, NY, USA)	Sirius, Hoechst 33342
FF02-438/24, FF01-483/32 (Semrock)	CFP (cyan fluorescent protein) の変異体
BP470-490, BP510-550 (オリンパス)	GFP (green fluorescent protein) の変異体、 MiCy, AcGFP1, MitoTracker Green FM
FF01-500/24-25, FF01-542/27 (Semrock)	YFP (yellow fluorescent protein) の変異体
BP520-550, BA580IF (オリンパス)	DsRed2, mCherry, mKate2, eqFP650, MitoTracker Red CMXRos, TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester)
FF02-628/40, FF01-692/40 (Semrock)	iRFP (near-infrared fluorescent protein)

GFP 変異体の pH 感受性の測定

HEK293T 細胞を 6 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 3×10^5 個播種し、24 時間培養後に pCAGGS-EGFP、ないし pFX-pHluorin、pFX-pHluorin S175、pFX-pHluorin V163/S175 を 1.0 μg 遺伝子導入した。24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、100 μl の NP40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4、150 mM NaCl、0.5% Nonidet P-40、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、10% グリセロール、1 mM Na_3VO_4 、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、100 mM NaF、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) で細胞を可溶化した。可溶化液を 4°C、 $20,400 \times g$ で 10 分間遠心分離して上清を回収した。

細胞溶解液は 1:9 の割合で、pH 4.5 から 8.5 まで調製されたマッキルベイン緩衝液 (20 mM Na_2HPO_4 、10 mM Citrate、150 mM NaCl) と混合し、うち 100 μl を Nunc Black polystyrene 96-well Microwell™ plate (Thermo Fisher Scientific) に移した。SpectraMax i3x multimode microplate reader (Molecular Devices) を用いて 470 nm $\pm$ 9 nm の励起光を当て、530 nm $\pm$ 15 nm における蛍光強度を検出した。NP40 lysis buffer からのバックグラウンドを減算した後、蛍光強度を

pH に従ってプロットし、最小二乗法を用いて以下の 4 パラメーターロジスティック曲線(DeLean et al., 1978)にフィッティングした。

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x/c)^b}$$

なお、 y : 蛍光強度、 x : プロトン濃度、 a : $x = 0$ のときの蛍光強度、 d : $x = \infty$ のときの蛍光強度、 c : $y = (a + d)/2$ のときのプロトン濃度、 b : 曲線の steepness を示す。 pK_a は次の等式を用いて計算した: $pK_a = -\log c$ 。得られたデータは、蛍光強度の最大値 d を 1、最小値 a を 0 として標準化し、平均 ± 平均の標準誤差 (standard error of the mean, SEM) としてプロットした。

生細胞での脱共役剤存在下におけるミトコンドリア pH 変化の測定

コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュ (AGC テクノグラス) に 3.0×10^4 個の Cos-1 細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。pFX-mito-pHluorin、pFX-mito-pHluorin V163/S175、pFX-pHluorin または pCAGGS-EGFP 1.0 μ g を遺伝子導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで一晩培養した。その後、50 nM TMRM (tetramethylrhodamine ethyl ester (perchlorate), Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) と 1 μ g/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を加えた DMEM 培地に置換し、37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分培養した。37°C に加温した PBS で洗浄した後、1 ml の DMEM/F12 培地に置換した。37°C に保温した蛍光イメージングワークステーションを用いてタイムラプス撮影を行い、開始 5 分後に終濃度 10 μ M になるように脱共役剤 FCCP (p-trifluoromethoxyphenylhydrazine, Cayman Chemical) を添加し、添加後 25 分間 (合計 30 分間) 観察した。蛍光イメージングワークステーションは、倒立型リサーチ顕微鏡 IX-81 (オリンパス)、検出器として冷却 charge-coupled device (CCD) カメラ Cool SNAP MYO (Photometrics, Tucson, AZ, USA)、励起光源として SOLA Light Engine (Lumencor) を使い、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices) で顕微鏡および周辺機器を制御した。フィルターセットは表 2 に示すものを用いた。対物レンズは開口数 0.40 の 10 倍対物レンズ (オリンパス) を使用し、サンプル周囲環境は Chamlide インキュベーターシステム (Live Cell Instrument) を用いて 37°C に保温した。

バックグラウンドを減算した後、MetaMorph ソフトウェアの Multi Wavelength Cell Scoring を用いて、Hoechst 33342 による核染色画像を参照し、1 細胞ごとの蛍光強度を定量した。各時点での蛍光強度を細胞の面積により加重

平均し、FCCP 添加時の蛍光強度によって標準化し、プロットした。

大腸菌を用いたミトコンドリアマトリックスマーカの精製

pGEX ベクターを用い、glutathione *S*-transferase (GST) ならびに mito を N 末端に融合させた蛍光タンパク質を大腸菌 JM109 株に発現させ、過去の報告に従って精製した (Smith and Johnson, 1988)。蛍光タンパク質を発現する大腸菌を 4°C、2,500 × *g* で 20 分間遠心分離し、2 mM EDTA と 1 mM ジチオトレイトール (DTT) を添加した PBS に再懸濁した。氷上で超音波破碎した後に、2% Triton X-100 を添加して室温で 10 分間置き、4°C、22,540 × *g* で 20 分間遠心分離して残渣を落とした。上清を回収し、glutathione Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare UK Ltd.) とともに 4°C、1 時間回転させた。ビーズに結合したタンパク質を PBS で 2 回洗浄し、Poly-Prep® Chromatography Columns (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) に充填した。50 mM Tris-HCl (pH 8.8) で 2 回洗浄した後、20 mM 還元型グルタチオンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) でタンパク質を溶出させた。

蛍光タンパク質のリフォールディング動態の定量

精製されたタンパク質を含む溶液を、等量の変性バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10%グリセロール、16 M 尿素、2 mM DTT) と混合し、95°C で 5 分間変性させた。変性したサンプルは Tris-NaCl-glycerol (TNG) バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10%グリセロール、1 mM DTT) で 100 倍希釈し、速やかに Nunc Black polystyrene 96-well Microwell™ plate (Thermo Fisher Scientific) に移し、SpectraMax i3x multimode microplate reader (Molecular Devices) を用いて 480 nm ± 9 nm の励起光を当て、510 nm ± 15 nm における蛍光強度を 30 秒間隔で 30 分間、経時的に検出した。変性したサンプルの蛍光強度からバックグラウンドを減算し、同時に蛍光を測定した未変性のサンプルの蛍光強度によって光退色を補正した。得られたデータを単一指数関数に当てはめることにより、フォールディング速度の係数 (k_{fold}) を計算した (Reid and Flynn, 1997)。式は以下の通りである：

$$F = F_{\infty}(1 - e^{(-k_{\text{fold}}t)})$$

なお、 F ：蛍光強度、 t ：時間 (秒)、 F_{∞} ： $t = \infty$ のときの蛍光強度を示す。

統計解析

得られたデータは、特に断りのない限り少なくとも 3 回の独立した試行から得られた平均 ± SEM で表示した。二以上の多群でコントロール群との比較を行

う際は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) を行って有意差の有無を判定し、Dunnett の検定により p 値を算出した。二以上の多群で群間比較を行う際は、one-way ANOVA で有意差の有無を判定し、Tukey の honestly significant difference (HSD) 検定により p 値を算出した。時系列データで比較を行う際は、多変量分散分析 (multivariate analysis of variance, MANOVA) により有意差の有無を判定し、Bonferroni の検定により p 値を算出した。

【実験結果】

各種オルガネラマーカースの作製

生細胞において標的オルガネラを正しく標識するオルガネラマーカース群を作製するため、12 種類のオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列と、6 種類の蛍光タンパク質について、すべての組み合わせのオルガネラマーカースの発現プラスミドを作製した。使用した配列はそれぞれ以下の通りである。オルガネラ局在タンパク質および局在配列：cytochrome c oxidase subunit VIII の MTS（以降 mito）、translocase of outer membrane 20（TOM20）、early endosome antigen 1（EEA1）、低分子量 G タンパク質（Rab5、Rab7、Rab11）、Sec61 β 、 β 1,4-galactose transferase（GalT）、Lifeact（*Saccharomyces cerevisiae* 由来のペプチド）、チューブリン β -4B、K-Ras 4B の C 末端超可変領域（C-terminal hypervariable region of K-Ras 4B, KRasCT）、ヒストン 2B（H2B）（Fujioka et al., 2018; Lakadamyali et al., 2006; Riedl et al., 2008; Shaner et al., 2008; Wu et al., 2016; Zurek et al., 2011）。蛍光タンパク質：Sirius、SECFP、EGFP、Venus、mCherry、iRFP713（以降 iRFP）（Filonov et al., 2011; Nagai et al., 2002; Shaner et al., 2008; Tomosugi et al., 2009）。作製したプラスミドをそれぞれ Cos-1 細胞と HeLa 細胞に遺伝子導入し、それらの局在を固定細胞において蛍光顕微鏡観察したところ、ほとんどのオルガネラマーカースはそれぞれ標的とするオルガネラに典型的な細胞内局在を示した（図 1-4）。具体例を挙げると、F-actin マーカーである Lifeact に蛍光タンパク質を融合させたものはアクチン骨格に特徴的な線維状の局在を示し、ゴルジ装置のトランスゴルジ網で機能する酵素である GalT との融合タンパク質はゴルジ装置の典型的な局在パターンである核近傍領域局在を示した。しかし、一部のオルガネラマーカースは生理的条件下での細胞において認められる標的オルガネラの構造とは異なる構造を形成した。例えば TOM20-iRFP は発現量が高い場合には凝集し、ミトコンドリア本来の構造であるヒモ状の構造は認められなかった（図 5A）。また、iRFP-Sec61 β は小胞状の構造や凝集を形成し、典型的な小胞体（endoplasmic reticulum, ER）の構造である網目状構造は認められなかった（図 2 左列）。また、ミトコンドリアマーカースおよびエンドソームマーカースについては、標的オルガネラ以外にもミスローカライゼーションするものが認められた。ミトコンドリアマトリックスマーカースとして作製した mito-EGFP はミトコンドリアのみに局在したが、他 5 種類の蛍光タンパク質を用いたマーカースでは細胞質と核にも蛍光が認められた（図 1 左列）。同様の現象

はエンドソームマーカーでも認められ、EGFP タグでは典型的なエンドソームの局在パターンである小胞状構造のみに局在したが、SECFP タグおよび Venus タグでは細胞質や核にも局在が認められた (図 5B)。以上のように、標的オルガネラを正確に標識するオルガネラマーカー群を作製することができた。

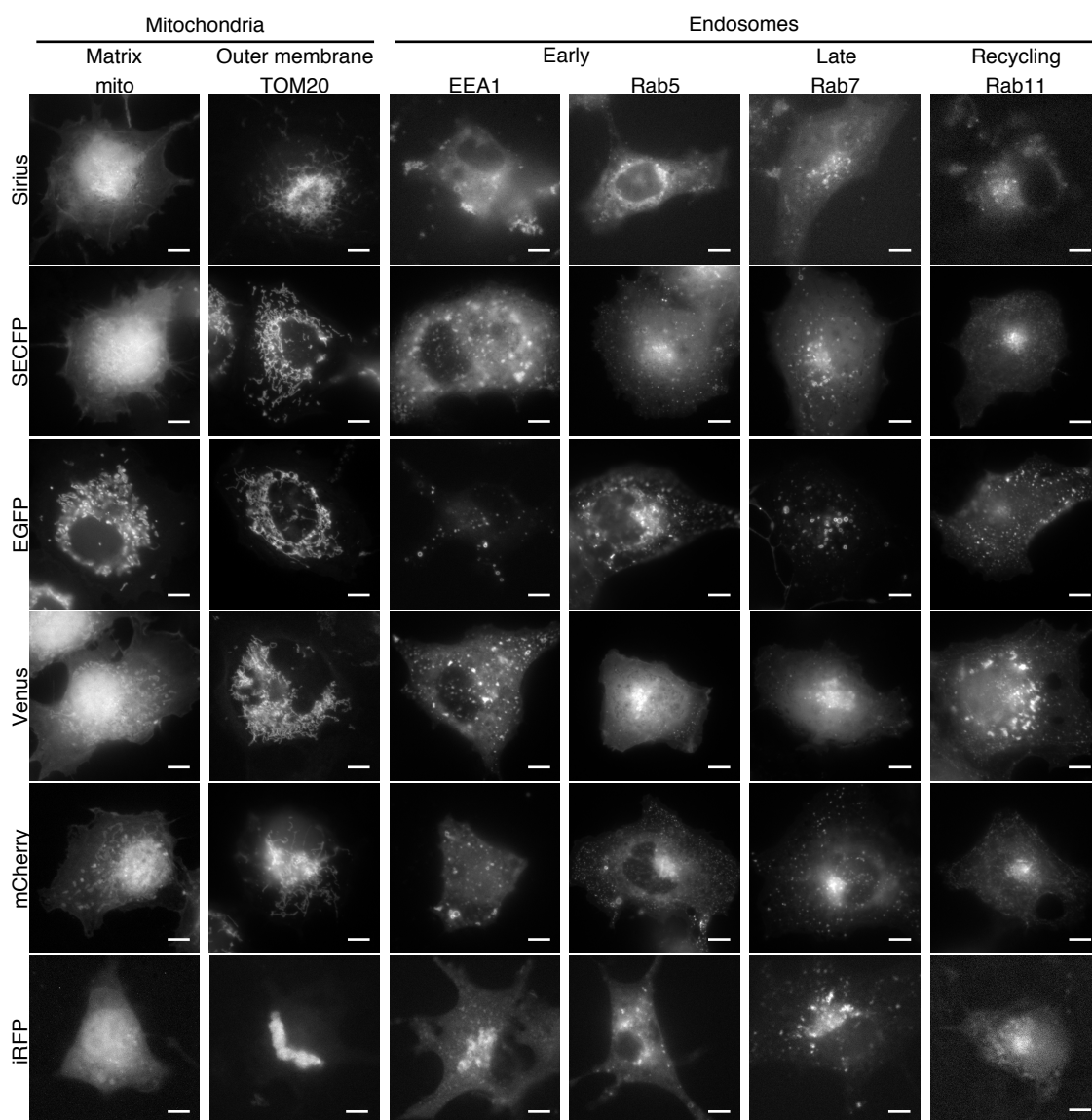


図 1 : Cos-1 細胞におけるオルガネラマーカールの局在 (ミトコンドリア、エンドソーム)

Cos-1 細胞にオルガネラマーカール (列の上を示すオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列と、列の左に示す蛍光タンパク質との融合タンパク質) の発現ベクターを導入して 24 時間培養し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)

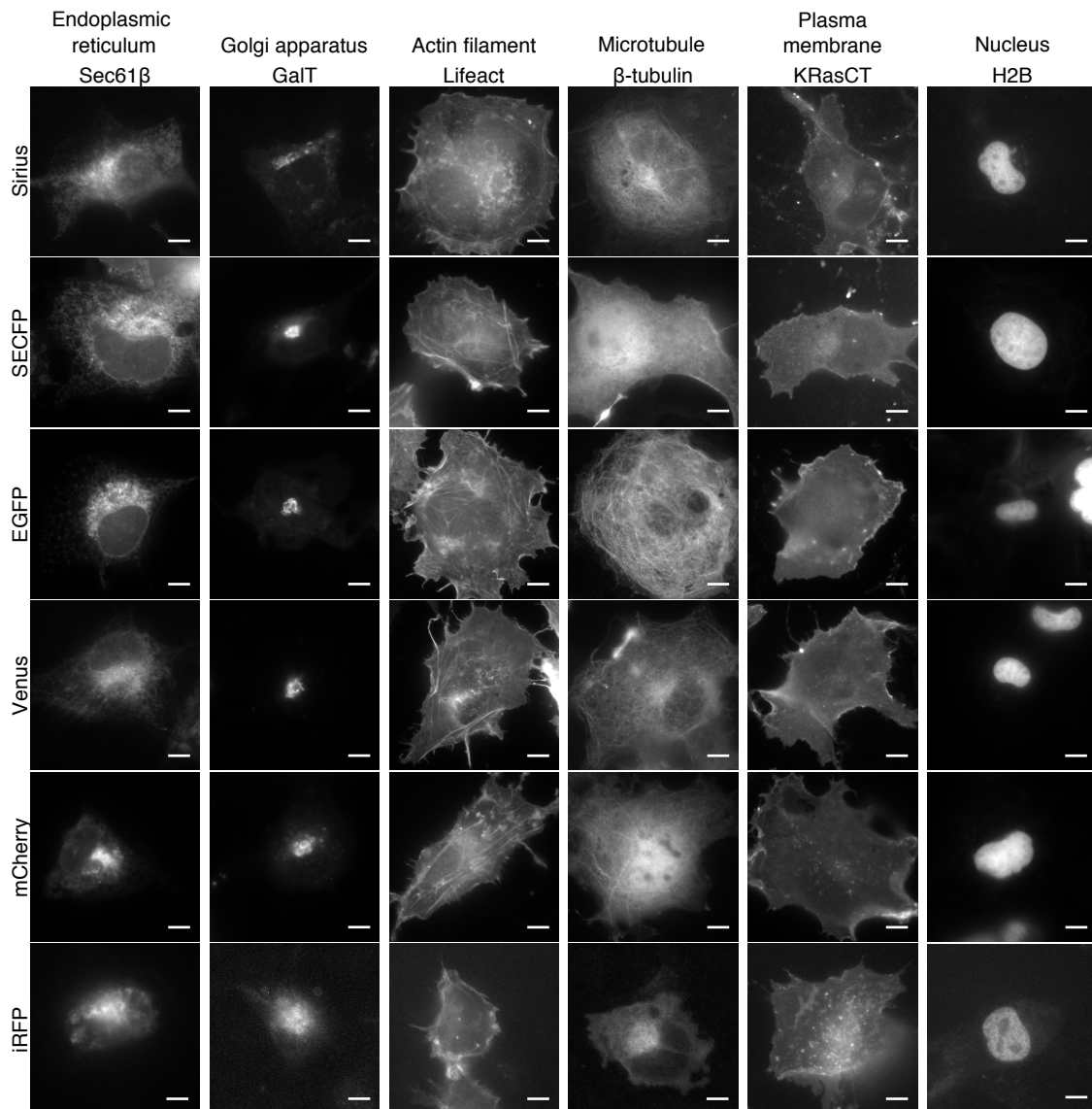


図 2：Cos-1 細胞におけるオルガネラマーカの局在（ER、ゴルジ装置、細胞骨格、細胞膜、核）

Cos-1 細胞にオルガネラマーカ（列の上を示すオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列と、列の左に示す蛍光タンパク質との融合タンパク質）の発現ベクターを導入して 24 時間培養し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光顕微鏡で観察した。（Bar = 10 μ m）

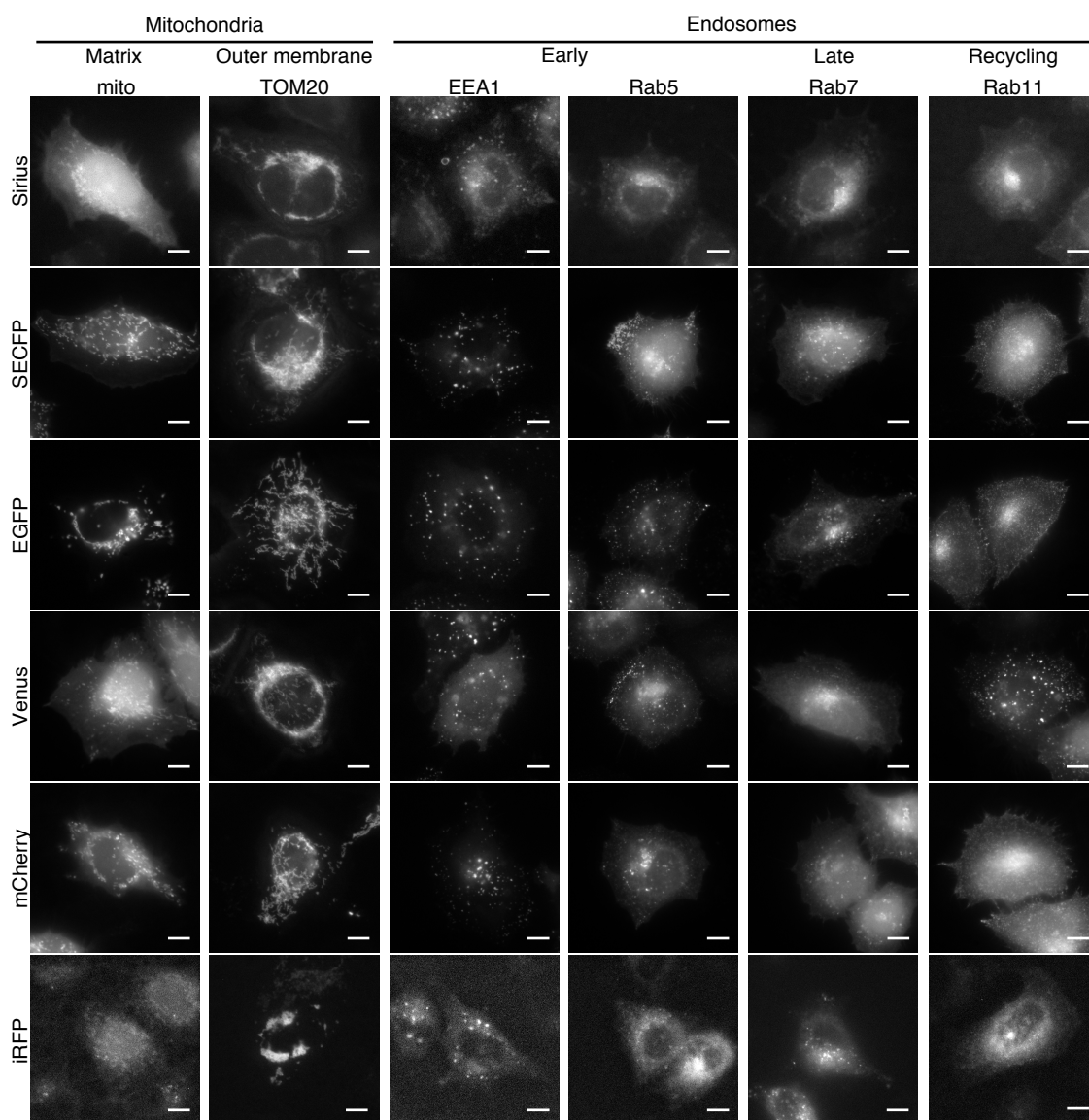


図 3 : HeLa 細胞におけるオルガネラマーカールの局在 (ミトコンドリア、エンドソーム)

HeLa 細胞にオルガネラマーカール (列の上を示すオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列と、列の左に示す蛍光タンパク質との融合タンパク質) の発現ベクターを導入して 24 時間培養し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)

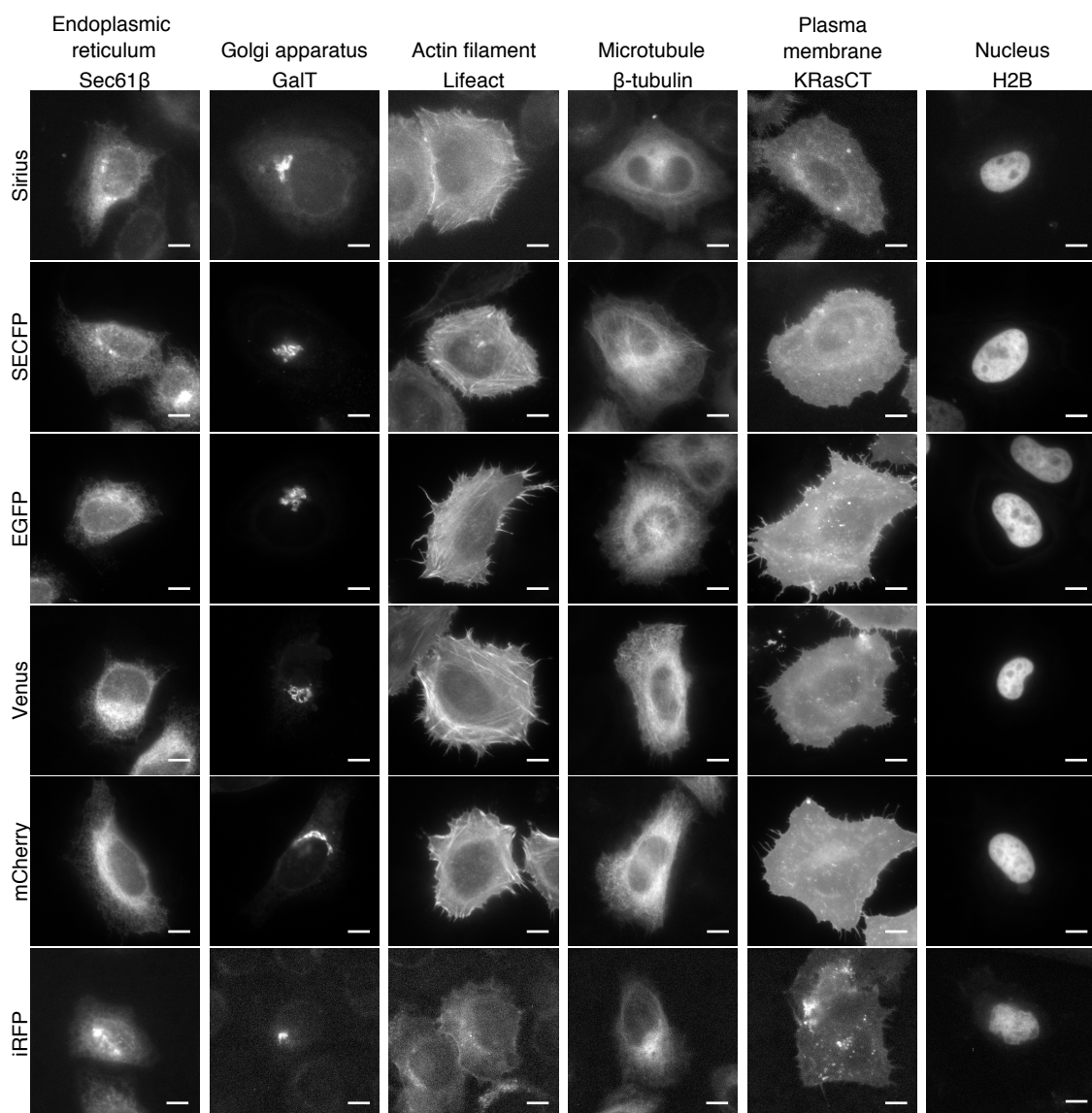


図 4：HeLa 細胞におけるオルガネラマーカの局在（ER、ゴルジ装置、細胞骨格、細胞膜、核）

HeLa 細胞にオルガネラマーカ（列の上を示すオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列と、列の左に示す蛍光タンパク質との融合タンパク質）の発現ベクターを導入して 24 時間培養し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光顕微鏡で観察した。（Bar = 10 μ m）

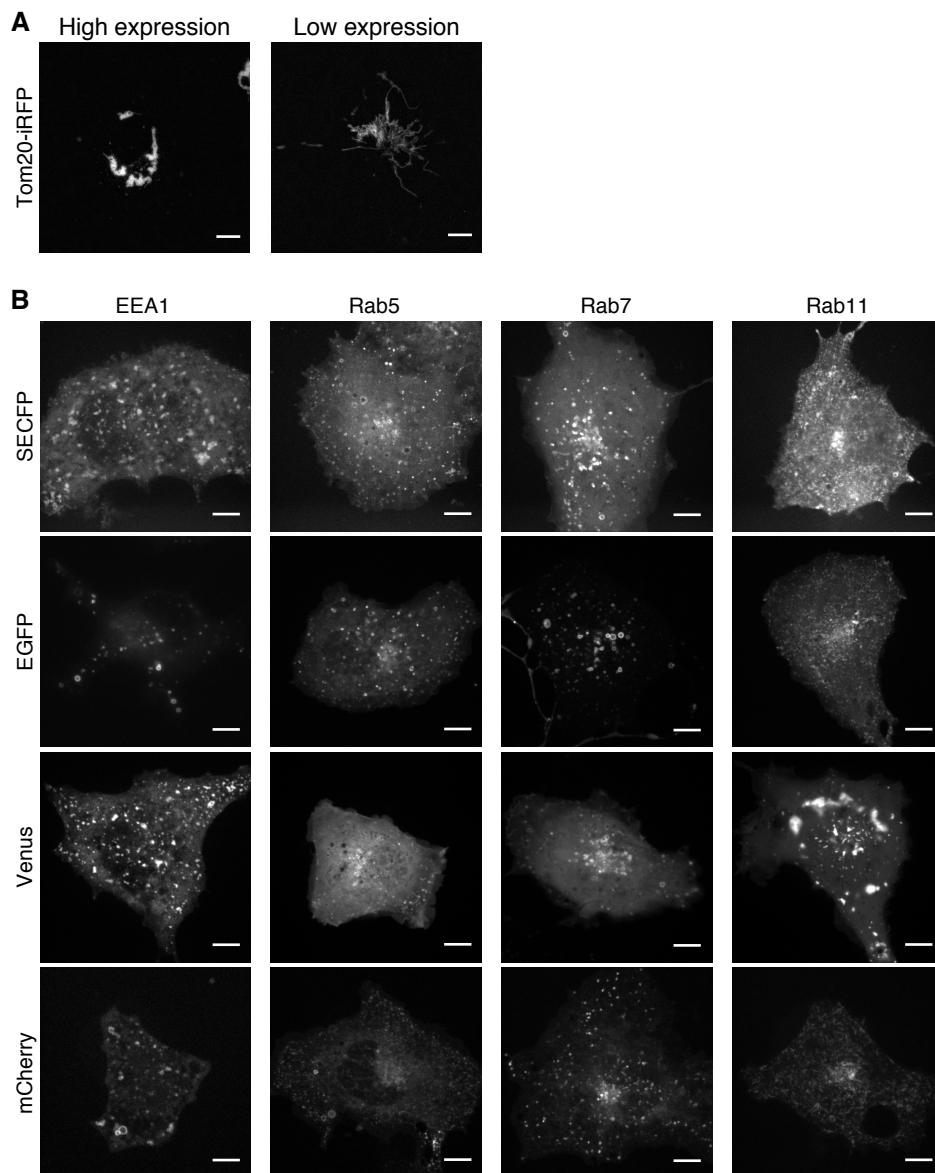


図 5:一部のオルガネラマーカ―では標的オルガネラとは異なる構造の形成や標的オルガネラ以外へのミスローカライゼーションが認められる

- A) Cos-1 細胞に Tom20-iRFP の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に蛍光顕微鏡で観察を行った。発現量の高い細胞と低い細胞を示す。(Bar = 10 μ m)
- B) Cos-1 細胞にエンドソームマーカ― (列の上を示すエンドソーム局在タンパク質と、列の左に示す蛍光タンパク質との融合タンパク質) を導入して 24 時間培養し、3%パラホルムアルデヒドで固定した後に共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)

ミトコンドリアマトリックスマーカーの局在は用いる蛍光タンパク質に影響される

作製したミトコンドリアマトリックスマーカーのうち、ミトコンドリアのみに局在したのは、mito-EGFP のみであった。そこで、ミスローカライゼーションを誘発する要因を調べるため、前項で使用した 6 種類の蛍光タンパク質に加え、新たに 3 種類の蛍光タンパク質と mito を組み合わせたマーカーの発現プラスミドを構築した。それらを導入した Cos-1 細胞を MitoTracker で染色し、共焦点顕微鏡下で各マーカータンパク質のミトコンドリア局在を検証した。コントロールとして用いた市販の mito-DsRed や、新たに作製した mito-MiCy、mito-mKate2、mito-eqFP650 はミトコンドリアのみに局在した (図 6)。これらはいずれも GFP が単離されたオワンクラゲ *Aequorea victoria* とは異なる生物種に由来する蛍光タンパク質を用いている。一方で、オワンクラゲ由来の GFP (*Aequorea victoria* GFP, avGFP) から派生した蛍光タンパク質を用いた mito-Sirius、mito-SECFP、mito-Venus、および DsRed の変異体を用いた mito-mCherry は図 1 での結果と同様にミトコンドリアだけでなく細胞質や核にも局在した (図 6)。

Cos-1 細胞を含む 5 種類の細胞株でも mito-SECFP のミトコンドリア局在を定量したところ、ミスローカライゼーションは Cos-1 細胞以外でも認められた (図 7A、B)。過去に mito と FRET バイオセンサーを融合し、そのミトコンドリア局在を HeLa 細胞において検証した研究では、その融合タンパク質は遺伝子導入後 24 時間では本研究と同様にミトコンドリア以外にもミスローカライゼーションしたと報告されている。しかし、遺伝子導入後 48 時間では 24 時間のものと比較して細胞質および核局在が減少すると報告されていた (Di Benedetto et al., 2013)。そこで、mito-SECFP の発現プラスミドを Cos-1 細胞に遺伝子導入し、導入後 24 時間、48 時間、72 時間の時点で蛍光顕微鏡観察を行った (図 7C)。ミトコンドリア領域の蛍光強度を測定し、それを細胞全体の蛍光強度で規格化することによりミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。以上により、マーカーのミトコンドリア局在を評価したが、各時点においてミトコンドリアの相対的な蛍光強度に有意差が認められなかったことから、本実験系では遺伝子導入後の培養期間を延長してもマーカーの局在は改善しないことが明らかになった (図 7D)。以上の結果から、本実験系でミトコンドリアマトリックスマーカーがミスローカライゼーションする原因は使用した蛍光タンパク質の種

類に依存することが示唆された。

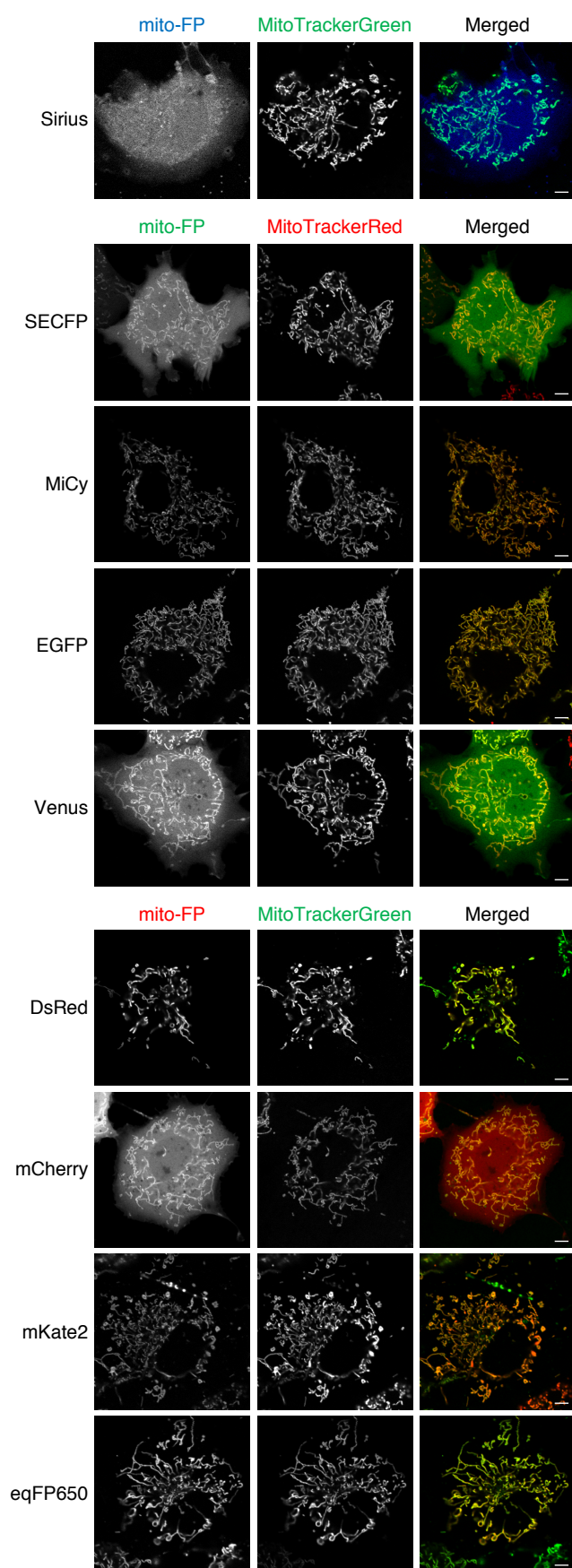


図 6: ミトコンドリア移行配列の局在は融合する蛍光タンパク質に影響される

Cos-1 細胞にミトコンドリアマトリックスマーカー (mito の C 末端に画像の左に示す蛍光タンパク質を融合させたタンパク質) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した。中列の上を示す MitoTracker®色素を終濃度 125 nM になるように添加した DMEM 100 μ l を細胞に加えて、37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分培養し、ミトコンドリアを染色した。走査型共焦点顕微鏡で取得した代表的画像を示す。
(Bar = 10 μ m)

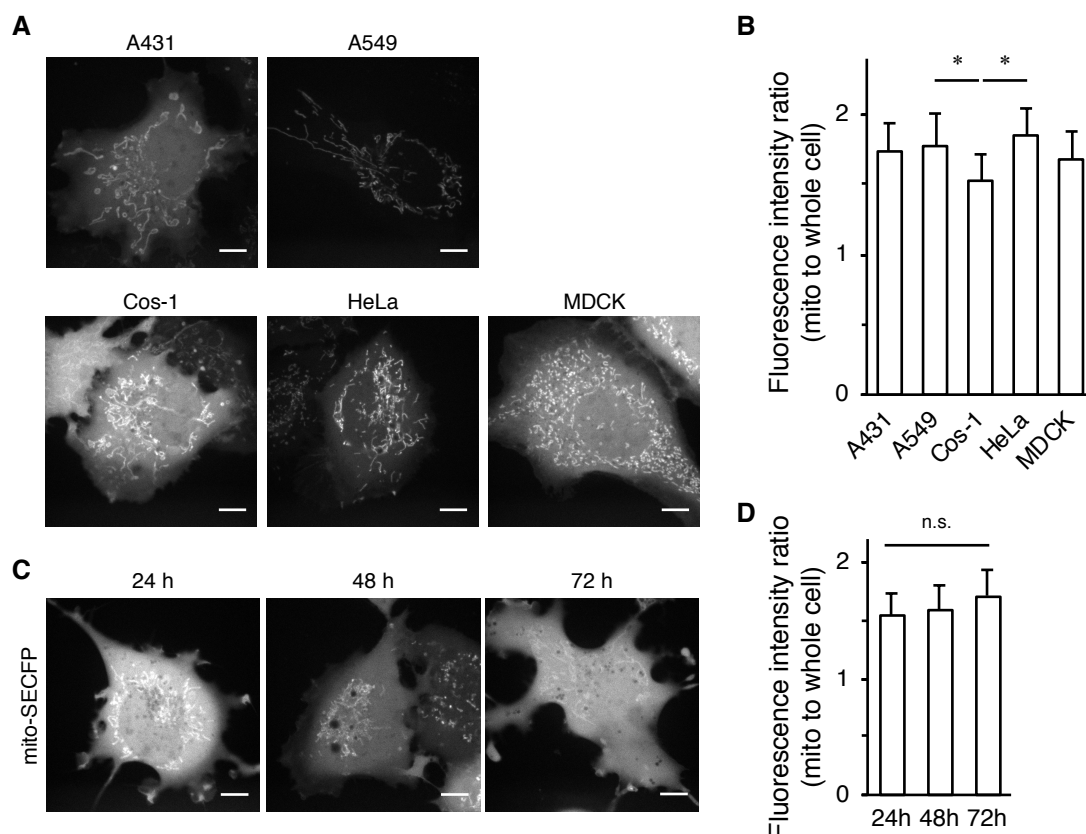


図 7:細胞種や遺伝子導入後の培養期間はミトコンドリアマトリックスマーカーの局在に影響を与えない

- A) A431、A549、Cos-1、HeLa および MDCK 細胞に mito-SECFP の発現ベクターを導入した。24 時間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で染色後に共焦点顕微鏡で観察した。画像は mito-SECFP を示す。(Bar = 10 μ m)
- B) A の画像データについて、MitoTracker Red CMXRos 画像から作成したミトコンドリアのマスク画像を用いてマーカーのミトコンドリア領域内の輝度を定量し、細胞全体の輝度で除算した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.01$ (Dunnett の検定)。
- C) Cos-1 細胞に mito-SECFP の発現ベクターを導入した。遺伝子導入後 24 時間、48 時間、72 時間の時点でそれぞれ、MitoTracker Red CMXRos で染色後に共焦点顕微鏡で観察を行った。画像は mito-SECFP を示す。(Bar = 10 μ m)
- D) C で取得した画像データについて B と同様に細胞全体に対するミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。n.s.: 有意差なし (Dunnett の検定)。

細胞質や核へのミスローカライゼーションを誘発する蛍光タンパク質にはフォールディング効率を上げる変異が導入されている

avGFP のなかで、EGFP のみが mito と融合した際に、ミスローカライゼーションせずミトコンドリアのみに局在した (図 1、3、6)。そこで、EGFP 以外に mito との融合タンパク質がミトコンドリアのみに局在する緑色蛍光タンパク質を探索するために、avGFP 変異体 (roGFP2、pHluorin)、および類縁種 *Aequorea coerulescens* に由来する AcGFP1 を用いたミトコンドリアマトリックスマーカーを作製し、その局在を検証した。なお、roGFP2 は酸化還元状態、pHluorin は pH を検出するために広く用いられているバイオセンサーである (Hanson et al., 2004; Sankaranarayanan et al., 2000)。作製した発現プラスミドを Cos-1 細胞に導入したところ、市販のミトコンドリアマトリックスマーカーとしても用いられている mito-AcGFP1 はミトコンドリアのみに局在した (図 8A)。一方、avGFP 変異体に関しては、mito-roGFP2 はミトコンドリアのみに蛍光が認められたが、mito-pHluorin は細胞質や核にも局在が認められた (図 8A)。そこで、ミスローカライゼーションを誘発する要因を同定するために、avGFP 変異体および AcGFP1 のアミノ酸配列を比較し、ミトコンドリアマーカーの局在との関係を検証したところ、ミスローカライゼーションを誘発する蛍光タンパク質には共通して、M153T/V163A/S175G のアミノ酸置換が認められた (図 8B、C)。これらはいずれも、avGFP のフォールディング効率を上げる変異 (フォールディング変異) として知られている (Nagai et al., 2002)。以上の結果から、フォールディング変異が導入された蛍光タンパク質はミトコンドリアマーカーのミスローカライゼーションを誘発することが示唆された。

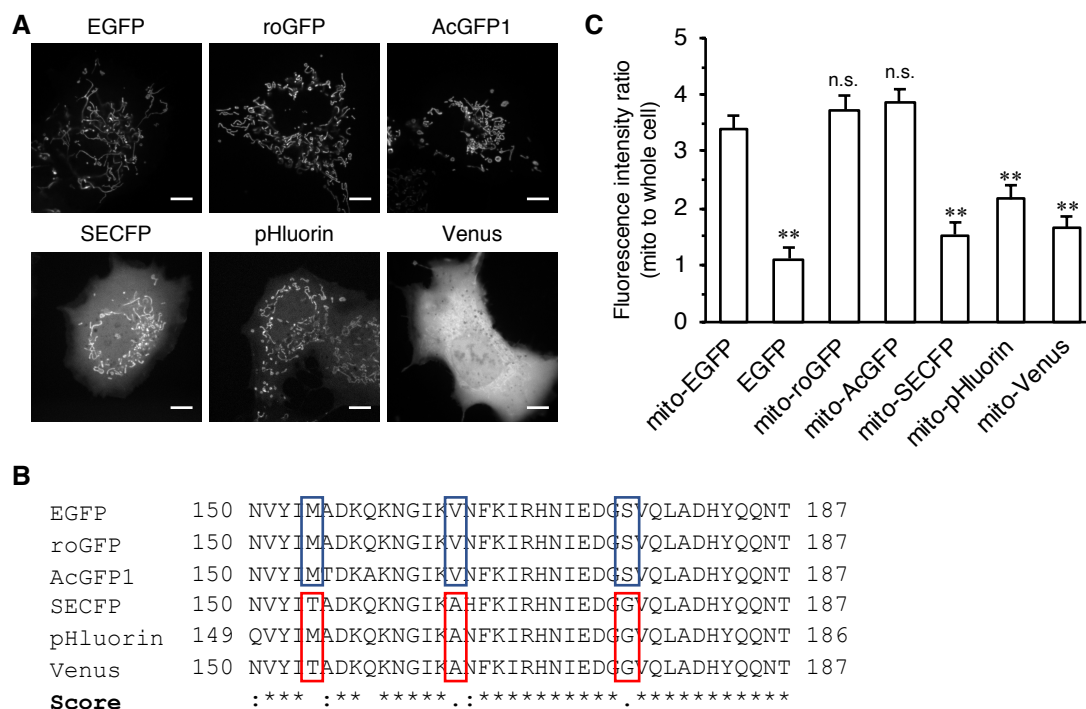


図 8: ミスローライゼーションを誘発する蛍光タンパク質にはフォールディング効率を上げる変異が導入されている

- A) 画像の上に示す蛍光タンパク質と mito とを融合したミトコンドリアマトリックスマーカーの発現ベクターを Cos-1 細胞に導入した。24 時間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。画像はミトコンドリアマトリックスマーカーを示す。(Bar = 10 μ m)
- B) A で用いた蛍光タンパク質のアミノ酸配列のアライメント。“.”は低いホモロジー、“:”は高いホモロジー、“*”は同じアミノ酸を示す。左右の数字は、左端および右端のアミノ酸の残基番号を示す。
- C) A の画像データについて図 7B と同様にして細胞全体に対するミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.0001$ 、n.s.: 有意差なし (Dunnett の検定)。

蛍光タンパク質への復帰変異の導入がミトコンドリアマーカーのミトコンドリア局在を促進する

フォールディング変異が導入された蛍光タンパク質を用いたミトコンドリアマーカーは細胞質や核にも局在するという前項の仮説を検証するため、mito-EYFP と mito-Venus のミトコンドリア局在を定量し、比較した。Venus は EYFP に M153T/V163A/S175G 等のフォールディング変異を導入して作製された EYFP の変異体であり、EYFP よりも速くフォールディングされる (Nagai et al., 2002)。予想と一致して、mito-Venus が細胞質や核にも局在したのに対し、mito-EYFP はミトコンドリアのみにおいて蛍光が認められた (図 9A、B)。さらに、M153T/V163A を含むフォールディング変異が導入され、EGFP よりも速くフォールディングされる superfolder GFP (sfGFP) (Pédélec et al., 2006) を用いてミトコンドリアマトリックスマーカーを同様に作製したところ、ミトコンドリア以外に細胞質や核にも局在を認めた (図 9C、D)。以上の結果は、前項の仮説を支持すると考えられる。

蛍光タンパク質に M153T/V163A/S175G フォールディング変異が導入されているとミトコンドリアマトリックスマーカーがミスローカライゼーションしたことから、pHluorin (V163A/S175G) に対しこれらの変異を野生型と同じアミノ酸に戻す復帰変異を導入することで、ミトコンドリアのみに局在させることが可能かどうかを検証した。その結果、mito-pHluorin は導入された復帰変異の個数に依存して細胞質・核局在が抑制され、復帰変異が二箇所ともに導入された mito-pHluorin V163/S175 はミトコンドリアのみに局在した (図 10A、B)。この結果から、V163A/S175G のフォールディング変異が mito-pHluorin のミスローカライゼーションに関与することが示唆された。実際に、in vitro でのリフォールディングアッセイにより、復帰変異を導入された mito-pHluorin V163/S175 のフォールディングは mito-pHluorin よりも遅延していることも確かめた (図 11A、B)。

上記の結果から、蛍光タンパク質にフォールディング復帰変異を導入することで、ミトコンドリアマトリックスマーカーの正しい局在を促進できることが確かめられた。改良された pHluorin V163/S175 を、音楽用語の“*a tempo*” (元の速さで、直前の速度変化を取り消しての意味を持つ) にちなみ、*at* pHluorin と命名した。

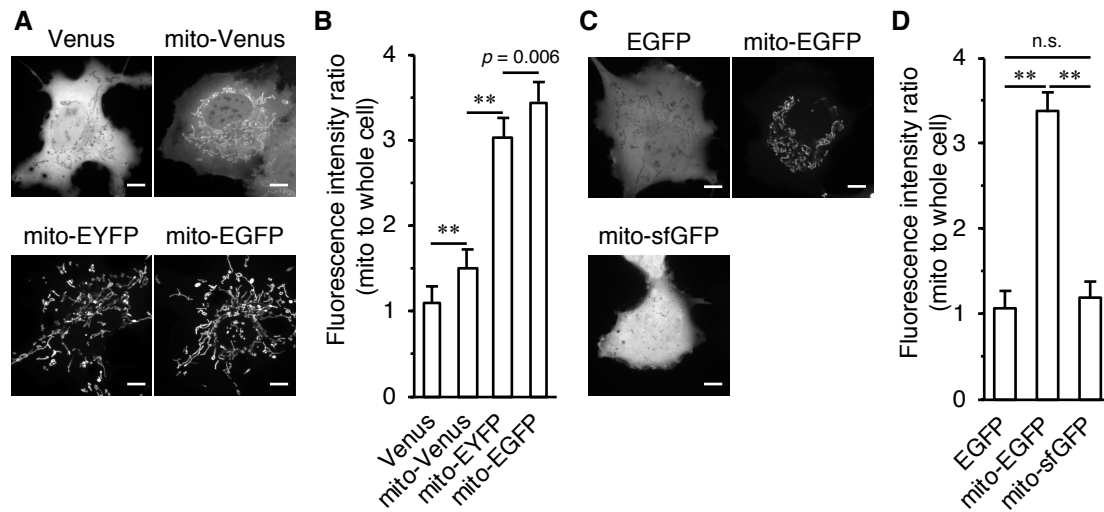


図 9: フォールディング変異が導入された蛍光タンパク質を用いたミトコンドリアマトリックスマーカーはミスローカライゼーションする

- A) Cos-1 細胞に、画像の上に示す蛍光タンパク質およびオルガネラマーカーの発現ベクターを導入した。24 時間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。画像は各ミトコンドリアマーカーの細胞内局在を示す。(Bar = 10 μ m)
- B) A の画像データについて図 7B と同様にして細胞全体に対するミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.0001$ (Dunnett の検定)。
- C) Cos-1 細胞に、画像の上に示す蛍光タンパク質およびオルガネラマーカーの発現ベクターを導入した。24 時間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で染色し、共焦点顕微鏡で観察を行った。画像は各ミトコンドリアマーカーの細胞内局在を示す。(Bar = 10 μ m)
- D) C の画像データについて図 7B と同様にして細胞全体に対するミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.0001$ 、n.s.: 有意差なし (Dunnett の検定)。

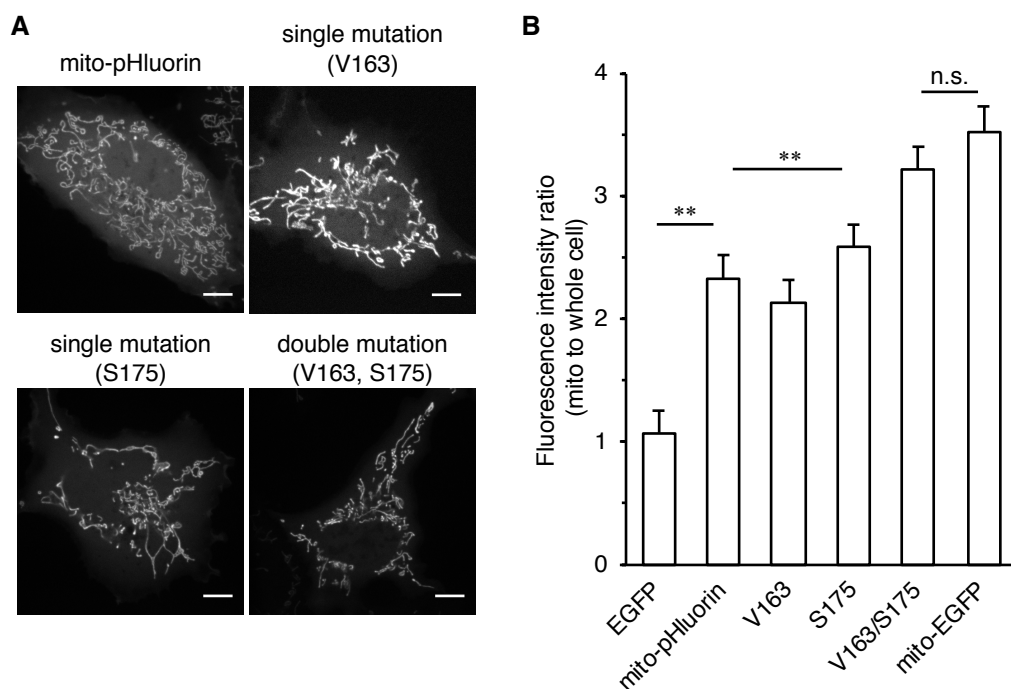


図 10：蛍光タンパク質への復帰変異導入がミトコンドリアマーカーのミスローカライゼーションを抑制する

- A) Cos-1 細胞に mito と pHluorin もしくは変異が導入された pHluorin の融合タンパク質の発現ベクターを導入した。24 時間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。画像は各ミトコンドリアマーカーの細胞内局在を示す。(Bar = 10 μ m)
- B) A の画像データについて図 7B と同様にして細胞全体に対するミトコンドリアの相対的な蛍光強度を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.0001$ 、n.s.: 有意差なし (Dunnett の検定)。

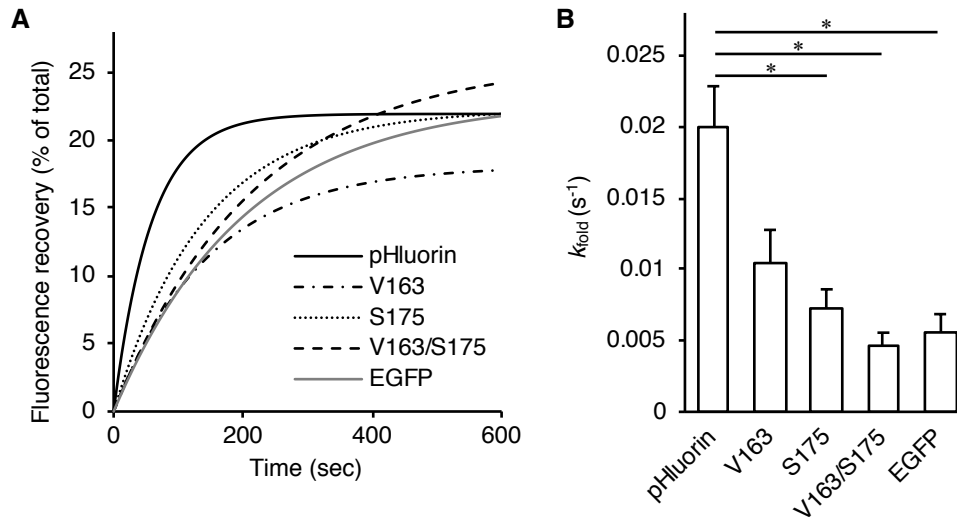


図 11：復帰変異の導入は pHluorin のフォールディング速度を低下させる

- A) 大腸菌 JM109 株に発現させた GST-mito-pHluorin、GST-mito-pHluorin V163、GST-mito-pHluorin S175、GST-mito-pHluorin V163/S175、GST-mito-EGFP を精製し、8 M 尿素 1 mM DTT 添加 TNG バッファー存在下で 95°C、5 分加熱した。熱変性したサンプルを 1 mM DTT 添加 TNG バッファーに 100 倍希釈してリフォールディングさせ、プレートリーダーを用いて蛍光の回復を 30 秒ごと測定した。単一指数関数：

$$F = F_{\infty}(1 - e^{(-k_{\text{fold}}t)})$$

による近似曲線を示す。なお、 F ：蛍光強度、 k_{fold} ：フォールディング速度の係数、 t ：時間（秒）、 F_{∞} ： $t = \infty$ のときの蛍光強度を示す ($n \geq 3$)。

- B) A の近似式における k_{fold} をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 ± 標準誤差を示す ($n \geq 3$)。*： $p < 0.02$ (Tukey の HSD 検定)。

mito-*atp*Hluorin はミトコンドリアマトリックス内 pH 変化を mito-pHluorin より正確に検出できる

pHluorin は生理的な範囲内の酸性条件下で蛍光強度が低下するため、mito と融合することでミトコンドリアマトリックスの pH センサーとして用いられている (Dittmer et al., 2009; De Michele et al., 2014)。しかし、mito-pHluorin は前述の通りミスローカライゼーションするため、細胞質や核の pH 変化に影響され、ミトコンドリアマトリックス内 pH 変化のみを捉えられていない可能性が考えられる。そこで、ミトコンドリアにのみ局在する mito-*atp*Hluorin が mito-pHluorin と比較して、ミトコンドリア内 pH 変化をより正確に検出できるかを検証した。まず、*at* pHluorin の pH 感受性が復帰変異の導入により変化していないことを *in vitro* で確認した (図 12A)。そこで、薬剤で人為的にミトコンドリア pH を変化させた際の蛍光強度変化を測定した。脱共役剤 p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP) はミトコンドリア膜のプロトンに対する透過性を高め、ミトコンドリア pH を低下させることが知られている (Aw and Jones, 1989)。FCCP 添加により mito-pHluorin と mito-*atp*Hluorin の蛍光強度はともに低下したが、mito-*atp*Hluorin の変化の方が mito-pHluorin のそれよりも小さかった (図 12B)。MitoTracker Red CMXRos を用いてミトコンドリアのマスキング画像を作成し、mito-*atp*Hluorin と mito-pHluorin のミトコンドリア領域の蛍光強度を定量解析すると、両者の蛍光強度の経時的変化に違いは認められなかった (図 13A)。すなわち、いずれのマーカーもミトコンドリア領域における蛍光強度変化は同様であったことが確認された。また、オルガネラ局在配列を持たない EGFP および pHluorin を発現させて細胞質の pH 変化を観察したところ、FCCP の添加によって pHluorin の蛍光強度が低下し、細胞質 pH が低下したことが確認された (図 13B)。これまでに、FCCP はミトコンドリア膜に作用してミトコンドリア pH を 8 から 7.5–7.4 程度に低下させること、および同じ条件で細胞質 pH も 7.2 から 6.5 へ低下させることが報告されている (Berezhnov et al., 2016; Cano Abad et al., 2004)。以上から、細胞全体で蛍光強度を測定した際に mito-pHluorin が mito-*atp*Hluorin よりも蛍光強度の変化が大きくなった原因は、細胞質の pH 変化に影響されたためであると予想された。

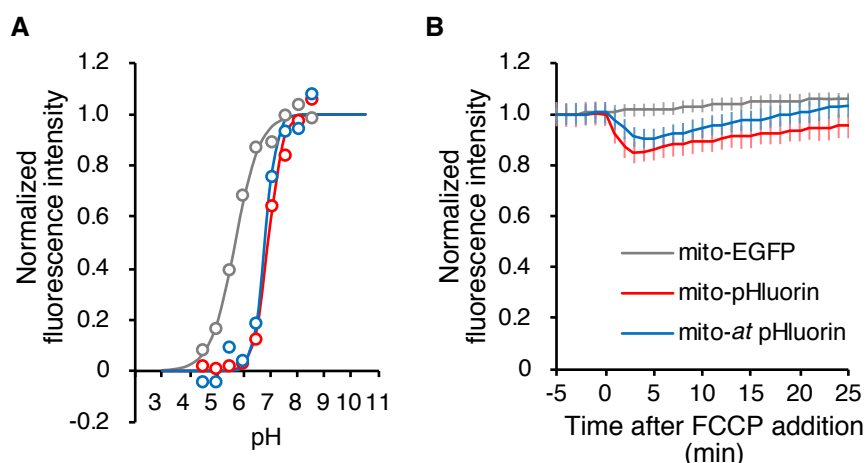


図 12: mito-*atpHluorin* はミトコンドリアマトリックス内 pH を mito-pHluorin より正確に検出できる

- A) HEK 293T 細胞に EGFP (灰)、pHluorin (赤)、*atpHluorin* (青) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に細胞溶解液を回収した。細胞溶解液を 1:9 の割合で、pH 4.5 から 8.5 まで調製されたマッキルベイン緩衝液と混合し、プレートリーダーを用いて蛍光強度を検出した。得られたデータを pH にしたがってプロットし、Hill の方程式にフィッティングした後、蛍光強度の最大値を 1、最小値を 0 として標準化した。pKa の値はそれぞれ mito-EGFP : 5.80、mito-pHluorin : 7.05、mito-*atpHluorin* : 6.98 であった。
- B) Cos-1 細胞に mito-EGFP (灰)、mito-pHluorin (赤)、mito-*atpHluorin* (青) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に培地を DMEM/F12 に置換した。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行い、時刻 0 の時点で終濃度 10 μ M になるように FCCP を加えた。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 145$)。p 値はそれぞれ mito-EGFP vs mito-pHluorin : 0.0006、mito-pHluorin vs mito-*atpHluorin* : 0.0011、mito-EGFP vs mito-*atpHluorin* : 0.0004 であった (MANOVA with Bonferroni correction)。

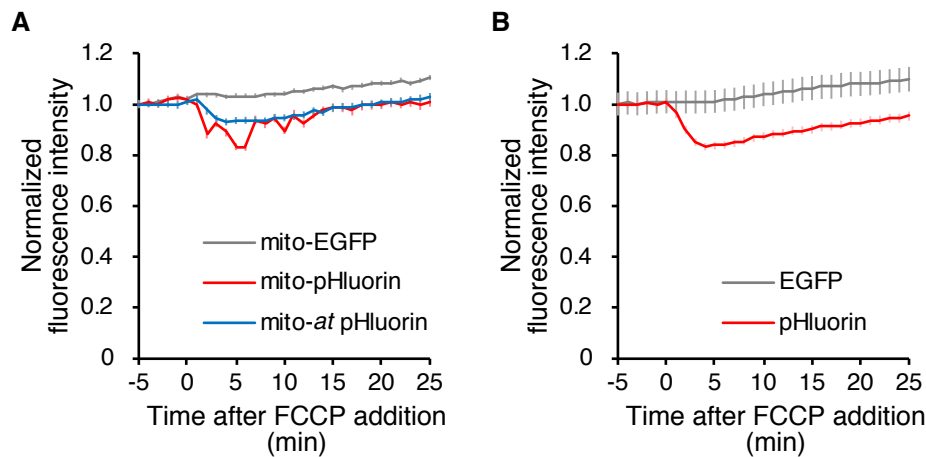


図 13 : mito-pHluorin の蛍光強度は細胞質の pH 変化に影響される

- A) 図 12B のデータから、マスク画像を用いてミトコンドリア領域の蛍光強度を測定した。データは平均±標準誤差を示す ($n \geq 145$)。 p 値はそれぞれ mito-EGFP vs mito-pHluorin : 0.0042、 mito-pHluorin vs mito-*at*pHluorin : 0.0036、 mito-EGFP vs mito-*at*pHluorin : 0.0004 であった (MANOVA with Bonferroni correction)。
- B) Cos-1 細胞に EGFP (灰)、pHluorin (赤) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に培地を DMEM/F12 に置換した。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行い、時刻 0 の時点で終濃度 10 μ M になるように FCCP を加えた。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す ($n \geq 60$)。

【考察】

本研究では、80 種類以上のオルガネラマーカースを作製し、大部分の組み合わせで目的のオルガネラに典型的な細胞内局在を示すことを確かめた。しかし、一部の組み合わせではミスローカライゼーションが生じることが判明した。ミトコンドリアマトリックスマーカースの場合、蛍光タンパク質のフォールディング効率を上げる変異がミトコンドリアへの局在を妨げることが明らかになった。また、同様の傾向はエンドソームマーカースでも認められた。iRFP を用いた ER マーカースやミトコンドリア外膜マーカースでは標的オルガネラの凝集が見られたが、iRFP-Sec61 β で見られた凝集は、ER 局在配列に多量体化能を持つタンパク質を融合させたことにより形成される、ER 膜の螺旋状構造 organized smooth ER (OSER) と類似していた (Snapp et al., 2003)。実際に iRFP は二量体化能を持つことが報告されている (Filonov et al., 2011)。TOM20-iRFP についても、TOM20 の C 末端側は細胞質に露出していることから、iRFP のホモダイマー形成を介してミトコンドリア外膜が接近し、凝集した構造を示した可能性が考えられる。以上から、iRFP を用いてオルガネラマーカース作製するためには iRFP の単量体化を検討する必要がある。

GFP が発見され、細胞に遺伝子導入するだけで補酵素や基質の添加なしに蛍光性を発揮することが判明して以来、蛍光タンパク質は細胞内のタンパク質やオルガネラの動態だけにとどまらず、個体内で特定の細胞系列の動態を捉えるためなどに広く用いられている (Day and Davidson, 2009; Timpson et al., 2011)。標的タンパク質を蛍光タンパク質で標識する際には、目的のタンパク質のアミノ酸配列の N 末端ないし C 末端、時には配列内に蛍光タンパク質を挿入する場合もある。原則的に標識方法は標的タンパク質の性質に従って選択されるが、標的タンパク質と蛍光タンパク質の組み合わせのすべてにおいて共通する法則は見つかっていないため、蛍光タンパク質による標識を行う際にはほとんどの場合で試行錯誤が必要となる。また、例えば蛍光タンパク質の分子量が標的タンパク質と比較して大きい場合、標的タンパク質のフォールディングや機能に影響が及ぶ可能性もある。これを防ぐ目的で蛍光タンパク質と標的タンパク質の間にリンカー配列を挿入することがあるが、このリンカー配列自身も標的タンパク質に影響を及ぼす因子の一つとなる。以上のように、蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を作製する際には、標識する位置、リンカー配列、および蛍光タンパク質自体の性質に注意を払う必要がある。本研究において、蛍光タンパク質

自身の性質がミトコンドリアマトリックスやエンドソームマーカの性能に影響を与えていることが示された。

大部分のミトコンドリアタンパク質は核内で DNA から転写され、細胞質で翻訳されてからミトコンドリアへと輸送される。したがって、ミトコンドリアタンパク質がミトコンドリアマトリックス内に局在するためには、TOM 複合体および TIM 複合体のポアを介して、ミトコンドリア外膜および内膜を通過する必要がある (Chacinska et al., 2009)。それぞれのポアの直径は 13 Å (Tim23) および 20 Å (Tom40) ほどであるため、アンフォールドされたタンパク質のみ通過できる (Pfanner and Truscott, 2002)。細胞質で翻訳されたミトコンドリアタンパク質は、アンフォールドされた状態もしくはゆるくフォールドされた状態で細胞質に存在し、細胞質中のターゲティング因子やシャペロンによってミトコンドリアへと輸送されると考えられている (図 14A)。一方で、細胞質で安定してフォールディングされるドメインを有するミトコンドリアタンパク質も報告されている (Bömer et al., 1997; Wienhues et al., 1991)。このようなミトコンドリアタンパク質では、ミトコンドリアのインポート機構が積極的にタンパク質をアンフォールドした後にミトコンドリア内へと輸送している。さらに、タンパク質の両端を強制的に牽引した際にアンフォールドされにくいミトコンドリアタンパク質ほど、ミトコンドリア内への輸送効率が低下することが報告されている (Eilers and Schatz, 1986; Sato et al., 2005; Wilcox et al., 2005)。本研究では pHluorin に関して、avGFP 変異体と MTS の一つ mito で構成されるミトコンドリアマーカが、蛍光タンパク質のフォールディング効率が高いほどミトコンドリアマトリックスへの局在が妨げられていた。また、本研究で作製した RFP 融合型ミトコンドリアマーカのうち、細胞質や核へのミスローカライゼーションが認められたのは mCherry を用いたもののみであった。この結果は、mito-DsRed Express がミトコンドリアのみに局在するのに対して、mito-mCherry が核や細胞質にも局在するという報告と一致する (Pastukh et al., 2008)。当該論文の著者らはフォールディング変異を含むアミノ酸変異が原因の一つと考察していた。実際に mCherry はフォールディング変異 (V7I/M182K) が導入されており、成熟 (翻訳からタンパク質がフォールディングし、発色団が形成されて蛍光性を得るまでの過程) に要する時間の指標となる t_{50} (蛍光タンパク質の蛍光強度が最大値の半分に達するまでの時間) は 15 分程度となっており、2 時間である DsRed Express と比較して大幅に短縮されている。すなわち、蛍光タンパク

質のフォールディング効率がミトコンドリアマトリックス局在に与える現象は avGFP だけでなく、RFP 変異体など他の蛍光タンパク質を用いた際にも共通する可能性がある。

フォールディング効率がミトコンドリア局在に影響する理由については、いくつかの仮説が考えられる。一つ目は、フォールディング効率の高い蛍光タンパク質は一度フォールドするとその状態で安定するため、ミトコンドリアのタンパク質輸送機構によりアンフォールディングされにくくなるというものである（図 14B）。実際に、フォールディング変異を持つ GFP39N (F99S/M153T/V163A) は野生型の avGFP と比較して熱に対する安定性が高く、熱変性によるアンフォールディングが起こりにくいことが報告されている (Aliye et al., 2015)。二つ目は、フォールドされた蛍光タンパク質が TOM 複合体および TIM 複合体のポアの直径よりも大きいために輸送が妨げられたり、細胞質中に存在するミトコンドリア輸送因子やシャペロンとの結合や、TOM 複合体による MTS の認識が妨げられるためにミトコンドリアへの局在が阻害されるという仮説である（図 14B）。もし本仮説が正しい場合、ミトコンドリアマトリックス内に融合タンパク質が輸送されるためには、ミトコンドリアマーカーの蛍光タンパク質部分はアンフォールドされた状態で保たなければならない。本研究においては mito-DsRed はミトコンドリアのみに局在したが、DsRed は一度フォールドされると EGFP よりも安定であることが報告されている (Verkhusha et al., 2003)。このため、フォールディング効率が高いほど、輸送機構に認識される前にフォールドされてしまい、ミトコンドリアに輸送されにくくなるとする後者の仮説がより確からしい。以上の 2 つの仮説を検証する方法としては、原子間力顕微鏡を用いた蛍光タンパク質のアンフォールディングの定量が有用であると考えられる (Perez-Jimenez et al., 2006)。

ミトコンドリアマトリックスマーカーについては、MTS を複数コピー融合させることでも細胞質や核への局在を抑制することが可能である。実際に、本研究では mito-Sirius を用いたマーカーがミスローカライゼーションを示したが、mito を 2 コピー使用した場合はミトコンドリアのみに局在することが報告されている (Tomosugi et al., 2009)。しかし mito のコピー数に比例して細胞に対する毒性が増加するとの報告があるため、mito 配列を増やすことには注意が必要である (Palmer et al., 2006)。

これまでに、蛍光タンパク質は量子効率や 37°Cでのフォールディング効率、

励起・蛍光波長、イオン濃度や光に対する安定性を変化させる目的で様々な変異体が作製されてきた (Day and Davidson, 2009; Tsien, 1998)。フォールディング効率の向上は蛍光タンパク質の成熟を促進し、発現した蛍光タンパク質の総量に対する蛍光性を持つ分子の割合を増加させることで細胞における輝度が増加されるため、フォールディング変異の導入された蛍光タンパク質はオルガネライメージングを含む様々な蛍光観察において頻用されている。しかし本研究によって、蛍光タンパク質にフォールディング変異が導入されていると、ミトコンドリアマトリックスマーカーのミトコンドリア局在が妨げられることが示された。

以上のことから、ミトコンドリアやエンドソームを含む一部のオルガネラに蛍光タンパク質を局在させる際には、フォールディング変異の導入されていないものを使用すべきであることを提唱する。オルガネラ局在の特異性を向上させることは、オルガネラの形態観察のみならず、オルガネラにおけるイオン濃度やシグナル伝達、タンパク質相互作用を検出する上でも有用である。本研究で作製した *mito-at pHluorin* により、補助的に他のオルガネラ標識色素を用いることなくミトコンドリア pH 変化を測定することができた。このように、単一のバイオセンサーのみで計測できることは、他の蛍光色素や蛍光タンパク、オルガネラマーカーなどと組み合わせた多色イメージングやフローサイトメトリー解析において有利である。

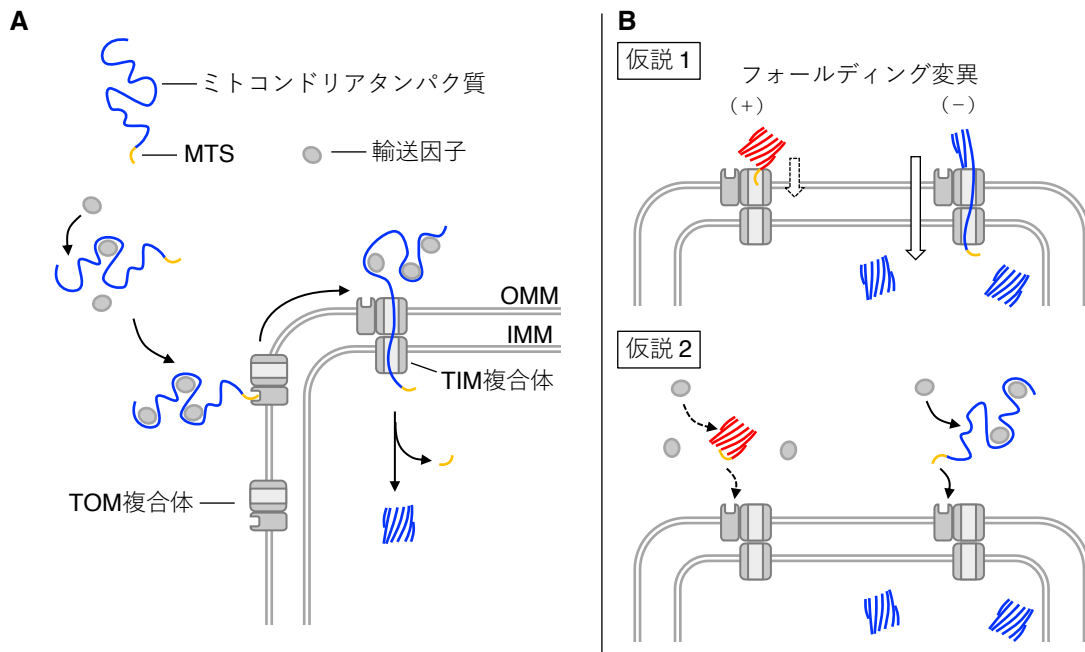


図 14：フォールディング変異を持つ蛍光タンパク質はミトコンドリアへの局在を妨げる

- A) 細胞質で翻訳されたミトコンドリアタンパク質は、アンフォールドされた状態もしくはゆるくフォールドされた状態で細胞質に存在し、細胞質中の輸送因子（ターゲティング因子やシャペロン）によってミトコンドリアへと輸送される。TOM 複合体の受容体がミトコンドリア移行配列 MTS を認識し、TOM 複合体、TIM 複合体を介してタンパク質をミトコンドリア内に輸送する。ミトコンドリアマトリックスに輸送されるとタンパク質はフォールディングし、MTS は切断を受ける。OMM：ミトコンドリア外膜、IMM：ミトコンドリア内膜。
- B) 蛍光タンパク質のフォールディング変異は、ミトコンドリアへのタンパク質輸送の過程を妨げる。仮説 1（上図）：フォールディング変異を持つ蛍光タンパク質（赤）は一度フォールドするとその状態で安定するため、ミトコンドリアのタンパク質輸送機構によりアンフォールディングされにくくなる。仮説 2（下図）：フォールドされた蛍光タンパク質によって、細胞質中に存在するミトコンドリア輸送因子やシャペロンと MTS の結合が阻害されるためにミトコンドリアへの局在が阻害される。

第 2 章：BCR-ABL のシグナル伝達における時空間的制御機構の解明

【緒言】

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座による Philadelphia (Ph¹) 染色体の出現により生じる骨髄増殖性疾患である。この相互転座により breakpoint cluster region (BCR) 遺伝子が非受容体型チロシンキナーゼをコードする *ABL* 遺伝子と融合し、*BCR-ABL* 遺伝子が形成される。ここから翻訳される BCR-ABL チロシンキナーゼは恒常的に活性化しており、下流シグナル経路を常に活性化することで CML を引き起こす。*BCR-ABL* 遺伝子は CML のドライバー遺伝子であり、実際、BCR-ABL を発現させることのみで血球系細胞株、初代培養の骨髄細胞のみならず、マウス線維芽細胞が形質転換する。また、BCR-ABL を発現させた骨髄細胞をマウスに移植すると、CML に類似した骨髄増殖性疾患が生じることが報告されている (Daley et al., 1990; Ren, 2005)。BCR-ABL の形質転換能はチロシンキナーゼ活性に依存しており、ABL の ATP 結合部位の点変異によってキナーゼ活性を喪失した BCR-ABL は造腫瘍能を失う (Zhang and Ren, 1998)。これら一連の研究に基づいて開発された ABL チロシンキナーゼ阻害薬は CML に対し目覚ましい治療効果を発揮し、第 1 世代の imatinib は CML 治療の第一選択となった (Druker et al., 1996, 2002)。

以上のように、ABL キナーゼ活性は造血細胞の形質転換において必須の役割を果たすが、ABL キナーゼの恒常的活性化のみでは CML を引き起こすことはできない。実際、Src homology (SH) 3 ドメインが欠失した恒常的活性化型 c-ABL は、マウスに骨髄増殖性疾患を発症させることはできない。したがって、BCR の機能ドメインが CML の病態に対して重要であることが示唆されている (Gross et al., 1999)。BCR には様々なドメインが存在し、それぞれについて造腫瘍能への関与が検証されてきた。例えば N 末端の coiled-coil (CC) ドメインは四量体化を介して BCR-ABL の自己リン酸化を促進し、これを欠失した p210 BCR-ABL をマウス骨髄細胞に発現させても骨髄増殖性疾患を呈さないことが報告されている (He et al., 2002)。また、BCR のセリン/スレオニンキナーゼドメインに存在する Y177 のリン酸化はアダプター分子 growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) の SH2 ドメインと結合することで Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路や PI3K/Akt 経路といった下流のシグナル経路の活性化に関与する (Sattler et al., 2002)。このように、BCR-ABL には ABL キ

ナーゼドメイン以外にも、キナーゼ活性の制御や下流のシグナル分子との相互作用を担うドメインやモチーフが存在しており、それらは c-ABL 単体にはない機能を付加することで CML の発症に寄与している (Ren, 2005)。

緒言 (p. 9) で述べた通り、細胞内シグナル伝達の多様性と特異性を制御するメカニズムの一つとしてシグナル伝達の時空間的制御が存在する。c-ABL キナーゼも核移行配列と核外移行配列を有しており、細胞内局在によってシグナル伝達を使い分けることが分かっている。実際、細胞質に局在した場合はアクチン線維のリモデリングと細胞増殖に関わり、核に局在した場合は DNA 損傷反応やアポトーシスの誘導に関与する (Posselt et al., 2019; Sirvent et al., 2008; Yoshida and Miki, 2005)。一方、BCR-ABL は c-ABL 由来の核移行配列を有するにも関わらず核局在が見られず、人為的に BCR-ABL を核に局在させると、ABL キナーゼ活性によってアポトーシスが誘導される (Ren, 2005)。このことから、BCR-ABL は BCR の融合によって c-ABL とは異なる時空間的制御を受けている可能性がある。しかし、BCR-ABL の細胞内局在については諸説紛紛としている。非血球系細胞に外来性に発現させた BCR-ABL は、ABL 領域 C 末端のアクチン結合ドメインを介して F-actin (Wertheim et al., 2003) や、Golgi 装置に局在する (Miroshnychenko et al., 2010) と報告されている。一方、内在性の BCR-ABL および外来性に発現させた BCR-ABL が、血球系細胞と非血球系細胞の両方で細胞質中に顆粒状構造を形成するとの報告もあり (Patel et al., 2008; Skourides et al., 1999)、議論の余地は少なくない。

近年 Fawal らによって、BCR-ABL と同様に染色体の相互転座によって形成され、未分化大細胞型リンパ腫の発症に関わるキメラタンパク質 nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) が細胞内で顆粒を形成することが報告された。さらにその報告において NPM-ALK 顆粒が、脂質膜を持たないオルガネラ (メンブレンレスオルガネラ) として注目される RNA 顆粒であると示されている (Fawal et al., 2006, 2011)。RNA 顆粒はタンパク質や RNA の液-液相分離によって生じる細胞質や核質中の小滴であり、核小体やストレス顆粒、processing body (P-body) などが代表的である。

当研究室では以前に、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET) の原理に基づき、生細胞で BCR-ABL キナーゼ活性を定量化するバイオセンサー Pickles (phosphorylation indicator of CrkL *en* substrate) を開発した (Mizutani et al., 2010)。また、患者由来の CML 細胞を用いた CML

分子標的薬の薬効予想法の樹立に成功している (Mizutani et al., 2010)。これら一連の研究過程で、BCR-ABL が細胞質中で顆粒状構造を形成することを見出した。本研究では、オルガネラマーカ―を用いて BCR-ABL の細胞内局在を明らかにし、その時空間的制御を解明することを目的とした。第 1 章で作製したオルガネラマーカ―を用いて、BCR-ABL との局在を比較したが、いずれのマーカ―とも共局在しなかった。そこで、細胞内で顆粒状構造を形成するオルガネラについて新たにマーカ―を作製し、同様の検証を行ったが、やはりいずれのマーカ―とも共局在が確認されなかった。そこで、BCR-ABL が形成する顆粒状構造の挙動を詳細に観察したところ、水溶液中の油滴と似た挙動を示すことに気付いた。免疫蛍光法を用いた局在の検討と薬剤による局在の変化から、BCR-ABL 顆粒はストレス顆粒であることを同定した。さらに、BCR-ABL 顆粒の形成には ABL キナーゼ活性と BCR の N 末端領域の双方が必要であること、および BCR-ABL 顆粒の形成が細胞増殖能の獲得に関与していることが示唆された。

【実験方法】

細胞培養

ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa (CCL-2)、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞株 Cos-1 (CRL-1650) は ATCC から購入した。ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 (RCB1897)、ヒト慢性骨髄性白血病細胞 Ku812 (RCB0495)、ヒト白血病由来細胞株 MY (RCB1701)、インターロイキン-3 (Interleukin-3, IL-3) 産生性マウス骨髄腫細胞 WEHI-3 (RCB0035)、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3-CL1 (RCB4474) は理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室（つくば）から購入した。ヒト pre-B 細胞白血病細胞 TOM-1 は急性リンパ性白血病患者の骨髄から樹立された Ph¹ 染色体陽性の細胞株である (Okabe et al., 1987)。ヒト B 細胞性リンパ芽球性白血病細胞 ALL/MIK は急性リンパ芽球性白血病患者の骨髄から樹立された Ph¹ 染色体陽性の細胞株である (Okabe et al., 1994)。HeLa、Cos-1 および WEHI-3 細胞は 10%FBS (Thermo Fisher Scientific) と 1% ペニシリンーストレプトマイシン (富士フイルム和光純薬) 含有 DMEM 培地 (Sigma-Aldrich) を用い、37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。K562 細胞は 10%FBS と 1% ペニシリンーストレプトマイシン含有ロズウェルパーク記念研究所 1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI 1640, Sigma-Aldrich) を用い、同様に 37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。Ku812、TOM-1、ALL/MIK 細胞は 10%FBS と 1% ピルビン酸ナトリウム、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有 RPMI 1640 培地を用い、同様に 37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。MY 細胞は 10%FBS と 1% ペニシリンーストレプトマイシン含有イーグル最小必須培地 (Minimum Essential Medium Eagle, MEM, Sigma-Aldrich) を用い、同様に 37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。Ba/F3-CL1 細胞は 10%FBS と 1% ペニシリンーストレプトマイシン含有 RPMI 1640 培地に対し IL-3 含有 WEHI-3 調整培養液を 9:1 で混合したものを使用し、同様に 37°C、5% CO₂、湿潤環境下で培養した。IL-3 含有 WEHI-3 調整培養液は、WEHI-3 細胞を約 80~90% コンフルエントになるまで培養し、上清を回収した後に 390 × g、5 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm フィルタ (Millipore, Darmstadt, Germany) で濾過して得た。

遺伝子導入

HeLa、Cos-1、K562、Ku812 および TOM-1 細胞への遺伝子導入はポリエチレンイミン (PEI Max 40K, Polyscience, Warrington, PA, USA) を用いた。導入方法は第 1 章と同様である。K562、Ku812、TOM-1、および Ba/F3-CL1 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入は Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza, Basel, Switzerland) を用いた。細胞をカウントし、 1.0×10^6 個を 15 ml コニカルチューブに移し、 $390 \times g$ 、5 分間遠心分離を行った後に上清を除去し、Solution V 100 μ l と精製プラスミドを加え、静かに混和し、Nucleofector II (Lonza) を用いてエレクトロポレーションを行った。なお、K562 細胞は T-016、Ku812 および TOM-1 細胞は C-005、Ba/F3-CL1 細胞は X-001 のプログラムを用いた。エレクトロポレーション後、細胞は速やかに回収して上記の培養条件でインキュベートした。

プラスミド構築

BCR-ABL および Pickles 2.34 の発現プラスミドは、以前に当教室で構築されたものを使用した (Horiguchi et al., 2017; Mizutani et al., 2010)。BCR-ABL のトランケーション変異体のコード配列は、以下のプライマーセットを用いた PCR により得た：BCR_F/BCR_fr1_R、BCR_fr2_F/BCR_fr2_R、BCR_fr3_F/BCR_fr3_R、BCR_fr4_F/BCR_fr4_R、BCR_fr5_F/BCR_fr5_R、BCR-ABL-J_F/BCR-ABL-J_R、ABL_fr1_F/ABL_fr1_R、ABL_fr2_F/ABL_fr2_R、ABL_fr3_F/ABL_fr3_R、ABL_fr4_F/ABL_fr4_R、ABL_fr5_F/ABL_R。BCR-ABL の N 末端欠失変異体 (BCR-ABL- Δ N) のコード配列は、同様に BCR_fr3_F/ABL_R のプライマーセットを用いた PCR により得た。得られた PCR 産物は *Xho*I/*Not*I により切断し、前章で作製した pFX-H2B-Venus または pFX-Venus-Rab5 の *Xho*I/*Not*I サイトにサブクローニングした。

FYVE、CD63、LAMP1、TMEM192 のコード配列は以下のプライマーセットを用いて PCR により増幅した：FYVE_F/FYVE_R、CD63_F/CD63_R、LAMP1_F/LAMP1_R、TMEM192_F/TMEM192_R。これらの配列は pFX-mCherry ないし pFX-eqFP650 ベクターの *Xho*I/*Not*I サイトにサブクローニングした。

プライマー

本研究で用いたプライマーを表 1 に示す。

表 1. 使用したプライマーリスト

No	Experiment	Primer name	Sequence (5' to 3')
1	Truncation	BCR_F	GCTCGAGATGGTGGACCCGGTGGGCTTC
2	Truncation	BCR_fr1_R	CGCGGCCGCGCCGGAAGCCCCATCGCTG
3	Truncation	BCR_fr2_F	GCTCGAGCAGCGATGGGGCTTCCGGCGCG
4	Truncation	BCR_fr2_R	CGCGGCCGCGCTCGACGCCGCAGCTGCTC
5	Truncation	BCR_fr3_F	GCTCGAGAGCAGCTGCGGCGTTCGACGG
6	Truncation	BCR_fr3_R	CGCGGCCGCTCATCTCCAAGCCCTTTTC
7	Truncation	BCR_fr4_F	GCTCGAGAGAAAATGGGTCTGTGCGGG
8	Truncation	BCR_fr4_R	CGCGGCCGCCATTGATGCTGGACAGGAAG
9	Truncation	BCR_fr5_F	GCTCGAGCTTCTGTCCAGCATCAATG
10	Truncation	BCR_fr5_R	CGCGGCCGCTCTGCAGCTCCACGGATGC
11	Truncation	BCR-ABL-J_F	GCTCGAGAGAAGCTTCTCCCTGGCATCCG
12	Truncation	BCR-ABL-J_R	GCGGCCGCAATCATAAGTGAACGAAAAG
13	Truncation	ABL_fr1_F	GCTCGAGCTTTTCGTTGCACTGTATG
14	Truncation	ABL_fr1_R	CGCGGCCGCGACACCATAGACAGTGGGCTTG
15	Truncation	ABL_fr2_F	GCTCGAGGCCCCAAAGCGCAACAAGC
16	Truncation	ABL_fr2_R	CGCGGCCGCTGAGATACTGGATTCTCTG
17	Truncation	ABL_fr3_F	GCTCGAGCAGGAATCCAGTATCTCAG
18	Truncation	ABL_fr3_R	CGCGGCCGCCCCGGGCTGGACTCCATGATG
19	Truncation	ABL_fr4_F	GCTCGAGATCATGGAGTCCAGCCCGGGC
20	Truncation	ABL_fr4_R	CGCGGCCGCTGAGAGGGATGAAGGCGGTG
21	Truncation	ABL_fr5_F	GCTCGAGATATCAACCCGAGTGTCTC
22	Truncation	ABL_R	CGCGGCCGACCTCTGCACTATGTCACTG
23	Organelle	CD63_F	GGCTCGAGCCCACCATGGCGGTGGAAGGAGGAATG
24	Organelle	CD63_R	TTGCGGCCGCGCATCACCTCGTAGCCACTTC
25	Organelle	FYVE_F	AACTCGAGGGGCCCCGGCACCATGTGGCAATCTAGTCAACGGAG
26	Organelle	FYVE_R	GGGCGGCCGCTCCTTGCAAGTCATTGAAAC
27	Organelle	LAMP1_F	AACTCGAGGCCACCATGGCGGCCCCGGGCGCCCCG
28	Organelle	LAMP1_R	TTGCGGCCGCTGATGGTCTGATAGCCCGCGTGAC
29	Organelle	TMEM192_F	GGCTCGAGCCCACCATGGCGGCGGGGGGCAGGAT
30	Organelle	TMEM192_R	GGGCGGCCGCCCCGTTCTACTTGGCTGACAGCCC

生細胞イメージング

サンプルの調整は以下のようにして行った。HeLa 細胞の場合は、コラーゲンコートした 35 mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、CO₂ インキュベーターにて 37°C で一晩培養した後に遺伝子導入し、さらに一晩培養してからフェノールレッドフリーの DMEM/F12 培地に置換した。K562 細胞の場合は、遺伝子導入を行った後に細胞を CO₂ インキュベーターにて 37°C で一晩培養し、390 × g、5 分間遠心分離を行った後に上清を除去し、フェノールレッドフリーの RPMI 1640 培地を加え、ポリ-L-リジンでコートした 35 mm ガラス底ディッシュに播種した。BCR-ABL 安定発現株の Ba/F3 細胞も同様にして RPMI 1640 培地を除去した後、フェノールレッドフリーの RPMI 1640 培地に置換し、ポリ-L-リジンでコートした 35 mm ガラス底ディッシュに細胞を播種した。

細胞の観察は、倒立型リサーチ顕微鏡 IX-83（オリンパス）を用いて行った。付属する機器類や使用したフィルターセットについては第 1 章に記載したものと同様である。

Imatinib 存在下での生細胞イメージングは 30 分間隔で行った。BCR-ABL-EGFP の場合は 9 時間、Venus-BCR-fr1 の場合は 6 時間観察した。撮影開始直前に、細胞に終濃度 2 μM になるように imatinib を添加した。Imatinib 存在下での生細胞 FRET イメージングは 30 分間隔で 9 時間行った。撮影開始から 10 分後に、細胞に終濃度 2 μM になるように imatinib を添加した。FRET 効率を示すため、バックグラウンドを減算した FRET、CFP 画像を用いて FRET/CFP 蛍光強度比を計算し、imatinib 添加時を time 0 として、この時点の FRET/CFP 蛍光強度比で標準化を行った。

免疫蛍光法

HeLa、Cos-1、K562、Ku812 および TOM-1 細胞を 3%PFA 存在下で 15 分間室温に置き、固定した。0.1% Triton X-100 を用いて 4 分間室温で膜透過処理し、1 μg/ml Hoechst 33342 を含有した 1%ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin, BSA）でブロッキングと核染色を行った。その後、0.05% polyoxyethylene sorbitan monolaurate 含有リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline with Tween 20®, PBT）で希釈した一次抗体（c-Abl, 1:1,000; Dcp1a, 1:1,000; Hsp90α, 1:200）を 100 μl 加えて 4°C、暗所に一晩置いた。免疫複合体は、PBT で 1:300 に希釈した二次抗体（Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647 標識抗体）を室温で 1 時間反応させて検出した。細胞の観察は

共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i（オリンパス）を用いて行った。

固定細胞における顆粒構造の定量

HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP を発現させ、シクロヘキシミドの場合は終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加して 2 時間、タプシガルギンの場合は終濃度 1 μM になるように添加して 1 時間、37°C の CO₂ インキュベーターにて培養した後、3% PFA で固定して Hoechst 33342 で核を染色した。FV10i を用いて観察し、1 細胞の頂部から底部までの Z スタック画像を 1 μm 間隔で撮影し、スタック 1 枚ごとに MetaMorph ソフトウェアの“Glanularity”プラグインを用いて自動的に顆粒構造を計数した。細胞領域は位相差画像を用いて決定した。

BCR-ABL 安定発現株の樹立

pCX4puro-DsRed、pCX4puro-DsRed-BCR-ABL、pCX4puro-DsRed-BCR-ABL- ΔN 、pCX4puro-mCherry-BCR-ABL- ΔN を *ScaI* によって直鎖化し、エタノール沈殿によって精製した後にエレクトロポレーションによって Ba/F3 細胞に遺伝子導入した。48 時間後に細胞を 2 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 含有の RPMI 1640 培地（IL-3 含有 WEHI-3 調整培養液を 10% 含む）に移し、7–8 日培養することで安定発現株を得た。

細胞増殖能アッセイ

前項で樹立した安定発現株を 37°C に加温した PBS で 3 回洗浄し、 1×10^6 個の細胞を IL-3 不含 RPMI 1640 培地 10 ml に播種した。その後 5 日間継続して培養し、生細胞を毎日計数した。死細胞はトリパンブルー染色によりカウントから除外した。細胞がコンフルエントに達しないよう、必要に応じて細胞数が 1.0×10^6 個/ml になるように希釈した。

細胞生存アッセイ

エレクトロポレーションによる遺伝子導入から 48 時間後、Ba/F3 細胞 (1.0×10^6 個) を 37°C に加温した PBS で 1 回洗浄し、1 ml の PBS に再懸濁した。ここに 1 μl の LIVE/DEAD™ Fixable Green Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific) を加え、暗所において室温で 30 分静置した。PBS で 1 回洗浄した後、細胞をポリ-L-リジンでコートした 35 mm ガラス底ディッシュに播種し、24 時間後に 3% PFA で固定した。c-Abl 抗体を用いた免疫蛍光法により BCR-ABL 発現細胞を検出した。

ウェスタンブロット

Ba/F3 細胞を 6 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 3×10^5 個播種し、24 時間培養後に細胞を 37°C に加温した PBS で洗浄し、100 μ l の NP40 lysis buffer で細胞を可溶化した。氷上に 30 分間静置した後、4°C、 $20,400 \times g$ で 10 分間遠心分離し、回収した上清を SDS-PAGE にて展開した。展開したタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) に転写した後、PVDF 膜を 0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate 含有トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline with Tween 20, TBS-T) で希釈した 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキング処理をした。その後 TBS-T で希釈した抗リン酸化チロシン抗体 (PY20 : 1:1000) (BD Bioscience, San Diego, CA) と PVDF 膜をハイブリ・バッグに入れて 4°C で一晩振盪した。PDVF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、続いて horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 二次抗体 (1:2500) (GE Healthcare) を加えて室温で 1 時間振盪した。TBS-T で 3 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) と LAS-1000 UV mini image analyzer (FUJIFILM、港区、東京) を用いて免疫複合体を検出した。

統計解析

得られたデータは、特に断りのない限り少なくとも 3 回の独立した試行から得られた平均 $\pm$ SEM で表示した。二群でのパラメトリック検定を行う場合は一元配置分散分析 (ANOVA) を行って有意差の有無を判定し、Student の t 検定により p 値を算出した。時系列データで比較を行う際は、多変量分散分析 (MANOVA) により有意差の有無を判定し、Bonferroni の検定により p 値を算出した。

【実験結果】

BCR-ABL は細胞質内で顆粒構造を形成する

BCR-ABL の細胞内局在を調べるため、内在性に BCR-ABL を発現する細胞で抗 c-Abl 抗体を用いて蛍光免疫法を行った。Ph⁺陽性細胞株である K562、Ku812、PALL-2、ALL/MIK、MY および TOM-1 細胞のすべてにおいて、BCR-ABL は細胞質中に顆粒状構造を形成した (図 15A)。前述の通り BCR-ABL の細胞内局在に関して諸説紛々としているが、この結果はそのうち Skourides らおよび Patel らの報告と一致する (Patel et al., 2008; Skourides et al., 1999)。外来性に発現させた BCR-ABL-EGFP も Ph⁺陽性細胞株 (図 15B) および非血球系細胞 (図 15C) において顆粒状構造を示したことから、BCR-ABL による顆粒状構造の形成は細胞種やその環境に依存する現象ではなく、BCR-ABL の内因性の性質に依るものであると考えられた。次に、これら顆粒状構造がどのオルガネラであるか同定するために、各種オルガネラマーカーとの共局在を検証した。細胞内で顆粒を形成するオルガネラとして、エンドソーム (初期、後期およびリサイクリング)、多胞体 (multivesicular body, MVB)、リソソームが候補として挙げられる。すでに Skourides らの報告ではエンドソーム関連のマーカー (EEA1、Rab7、transferrin、LysoTracker、caveolin) と BCR-ABL との共局在は否定されている (Skourides et al., 1999)。また、よりオルガネラの種類を増やして検証するため、第 1 章で作製したオルガネラマーカーに加え、新たに初期エンドソーム (FYVE)、MVB (CD63)、後期エンドソーム (LAMP1、TMEM192) のマーカーを作製した。しかし、BCR-ABL-EGFP の形成する顆粒構造は、いずれのオルガネラマーカーとも共局在しなかった (図 16)。この結果は Skourides らの報告と一致する (Skourides et al., 1999)。以上の結果から、BCR-ABL は細胞質中に、既知のオルガネラとは異なる顆粒構造を形成することが示唆された。

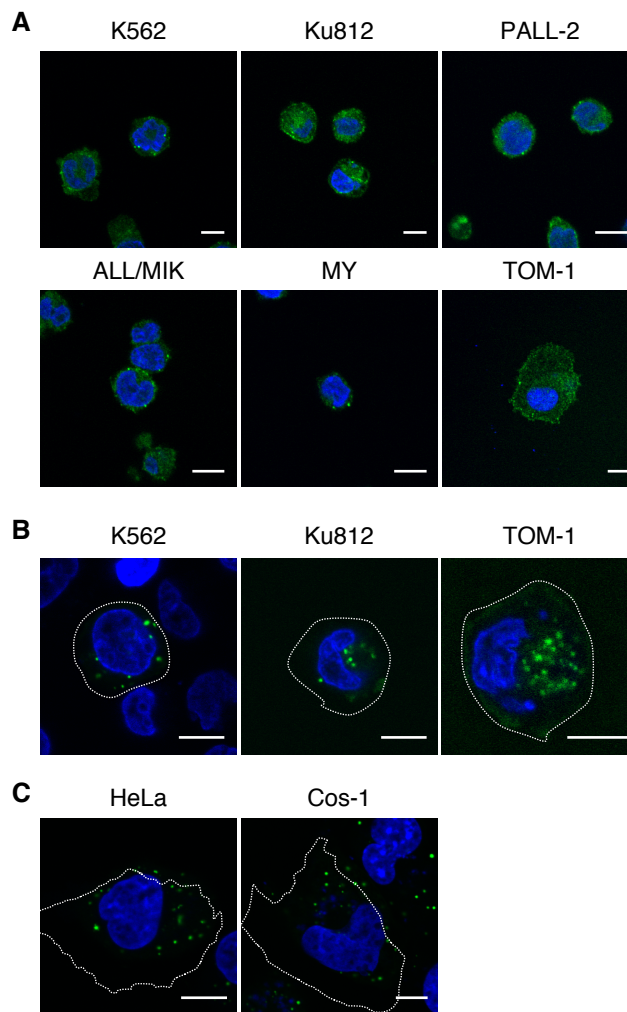


図 15 : BCR-ABL は細胞質中に顆粒状構造を形成する

- A) 画像の上に示す Ph¹ 陽性細胞株を 3%PFA で固定し、抗 c-Abl 抗体（緑）を用いて蛍光免疫法を行った。核は Hoechst 33342（青）を用いて可視化し、共焦点顕微鏡で観察した。（Bar = 10 μm）
- B) 画像の上に示す Ph¹ 陽性細胞株に BCR-ABL-EGFP（緑）を発現させ、24 時間後に固定して核を Hoechst 33342（青）で染色した。観察は共焦点顕微鏡で行った。（Bar = 10 μm）
- C) 画像の上に示す非血球系細胞に BCR-ABL-EGFP（緑）を発現させ、24 時間後に固定して核を Hoechst 33342（青）で染色した。観察は共焦点顕微鏡で行った。（Bar = 10 μm）

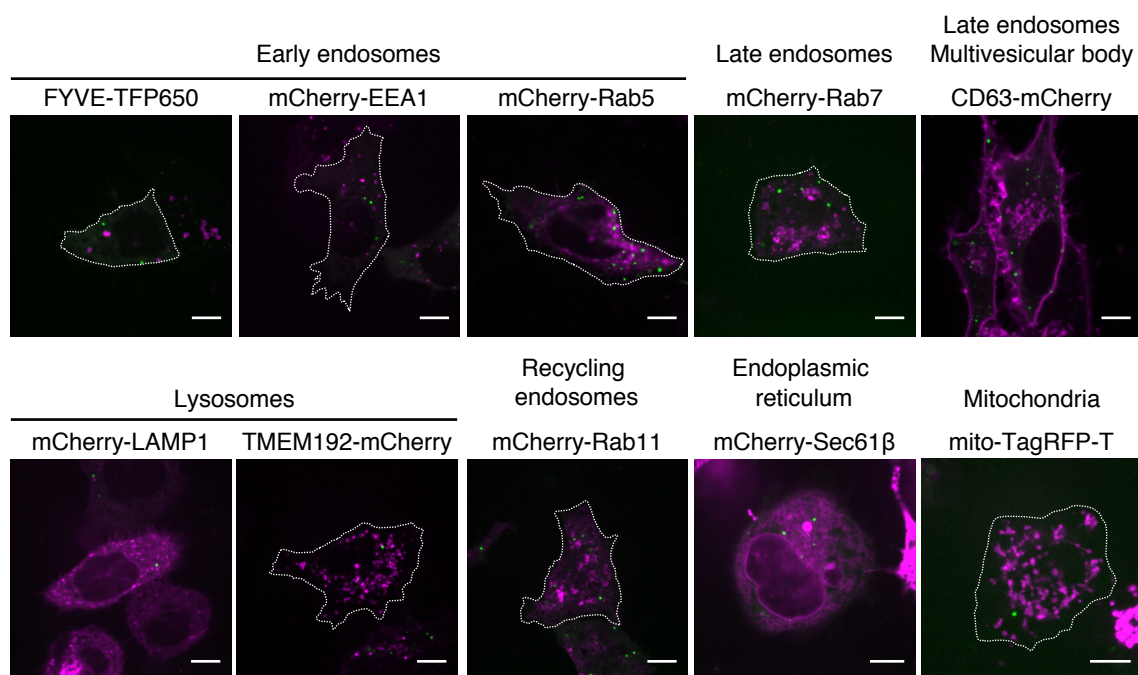


図 16 : BCR-ABL が形成する顆粒は既知のオルガネラのマーカーとは共局在しない

HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP (緑) および画像の上を示すオルガネラマーカー (マゼンタ) を発現させ、24 時間後に固定して共焦点顕微鏡で観察した。点線は 1 細胞の領域を表す。最上段にマーカーが標的とするオルガネラを示す。(Bar = 10 μ m)

BCR-ABL はストレス顆粒に集積する

BCR-ABL-EGFP を K562 細胞に発現させ、その挙動を生細胞イメージングで追跡していた際に、BCR-ABL の顆粒構造が融合と分離を繰り返し、液滴のような振る舞いを示すことに気づいた (図 17)。この性質はストレス顆粒、P-body といった、脂質膜を持たないメンブレンレスオルガネラである RNA 顆粒に共通する性質である (Banani et al., 2017)。さらに、BCR-ABL と相互作用することが知られている熱ショックタンパク質 heat shock protein 90 (Hsp90) がストレス顆粒と共局在することを考慮すると (An et al., 2000; Matsumoto et al., 2011; Pare et al., 2009)、BCR-ABL の形成する顆粒状構造がストレス顆粒である可能性が示唆された。そこで、BCR-ABL-EGFP を発現する HeLa 細胞に翻訳阻害薬シクロヘキシミド (mRNA をリボソーム上に固定することで RNA 顆粒の形成を阻害する) (Mollet et al., 2008) を添加したところ、顆粒構造が減少したことから、BCR-ABL が形成する顆粒状構造は RNA 顆粒であることが支持された (図 18A)。BCR-ABL-EGFP もしくは EGFP を発現する HeLa 細胞を固定し、RNA 顆粒マーカーである Hsp90 α に対する抗体、および P-body の構成要素である mRNA デキャッピング酵素 Dcp1a に対する抗体で蛍光免疫法を行った。その結果、Hsp90 α は BCR-ABL 非発現細胞では細胞質にびまん性に局在したのに対し、BCR-ABL 発現細胞では顆粒状構造を形成し、BCR-ABL 顆粒と共局在した (図 19A)。この現象は K562 細胞でも同様に確認された (図 19B)。一方、Dcp1a は BCR-ABL 非発現細胞でも顆粒形成を示したが、それら顆粒は BCR-ABL-EGFP が形成する顆粒状構造とは異なる局在を示した (図 19C)。さらに、ER ストレスを介してストレス顆粒形成を誘導する Ca²⁺-ATPase 阻害薬タプシガルギン (Thomas et al., 2009) を、BCR-ABL-EGFP を発現する HeLa 細胞に添加したところ、BCR-ABL-EGFP の顆粒状構造の数が増加した (図 18B)。以上の結果から、BCR-ABL がストレス顆粒に集積すること、さらに BCR-ABL の発現によってストレス顆粒の形成が促進されることが示された。

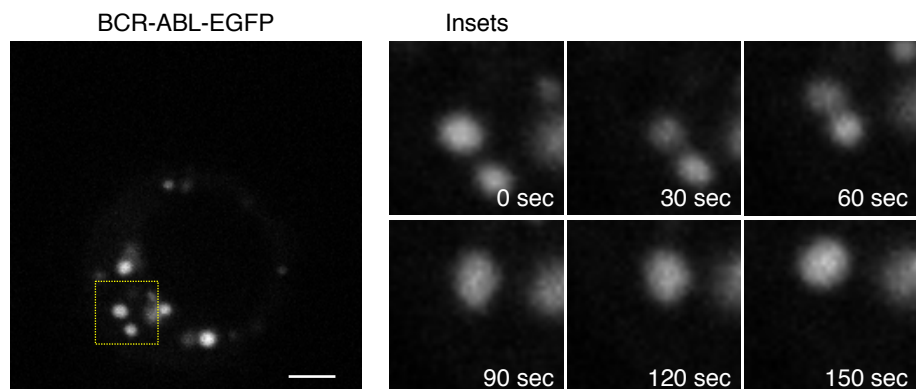


図 17：BCR-ABL 顆粒は細胞質中で液滴と同様の振る舞いを示す

K562 細胞に BCR-ABL-EGFP の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に共焦点顕微鏡でタイムラプス観察を行った。撮影インターバルは 30 秒である。左の画像は 0 秒の時点での一細胞全体の蛍光画像。右の画像は BCR-ABL 顆粒が融合する様子を経時的に示した拡大図である（左図の点線枠部分）。（Bar = 10 μm ）

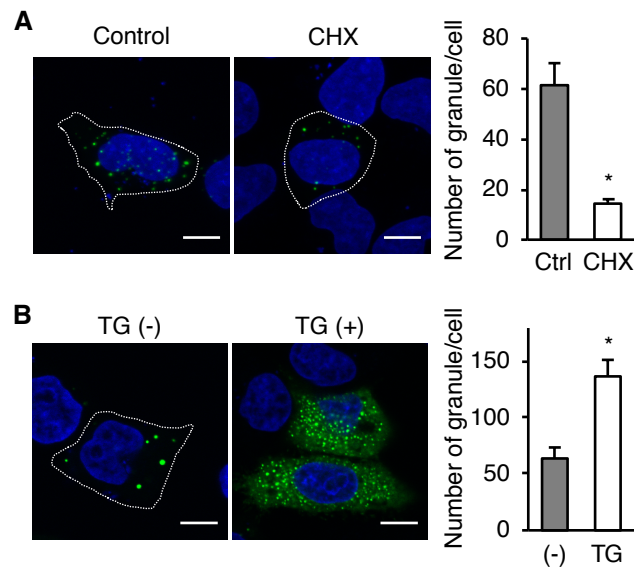


図 18 : BCR-ABL 顆粒の形成は RNA 代謝や ER ストレスに影響される

- A) HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した。10 $\mu\text{g/ml}$ シクロヘキシミド (cycloheximide, CHX) を加えて 2 時間培養した後固定し、核を Hoechst 33342 (青) で染色した。共焦点顕微鏡で一細胞の頂部から底部までの Z スタック画像を 1 μm 間隔で撮影し、スタック画像ごとに顆粒の数を測定し、合算して一細胞あたりの顆粒数を求めた。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。*: $p < 0.0001$ (Student's t -test)。画像はスタック画像を最大値投影法で表し、一細胞の領域を点線で示している。(Bar = 10 μm)
- B) HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した。10 μM タプシガルギン (thapsigargin, TG) を加えて 1 時間培養した後固定し、核を Hoechst 33342 (青) で染色した。一細胞あたりの顆粒数は A と同様にして定量した ($n \geq 32$)。*: $p < 0.0001$ (Student's t -test)。(Bar = 10 μm)

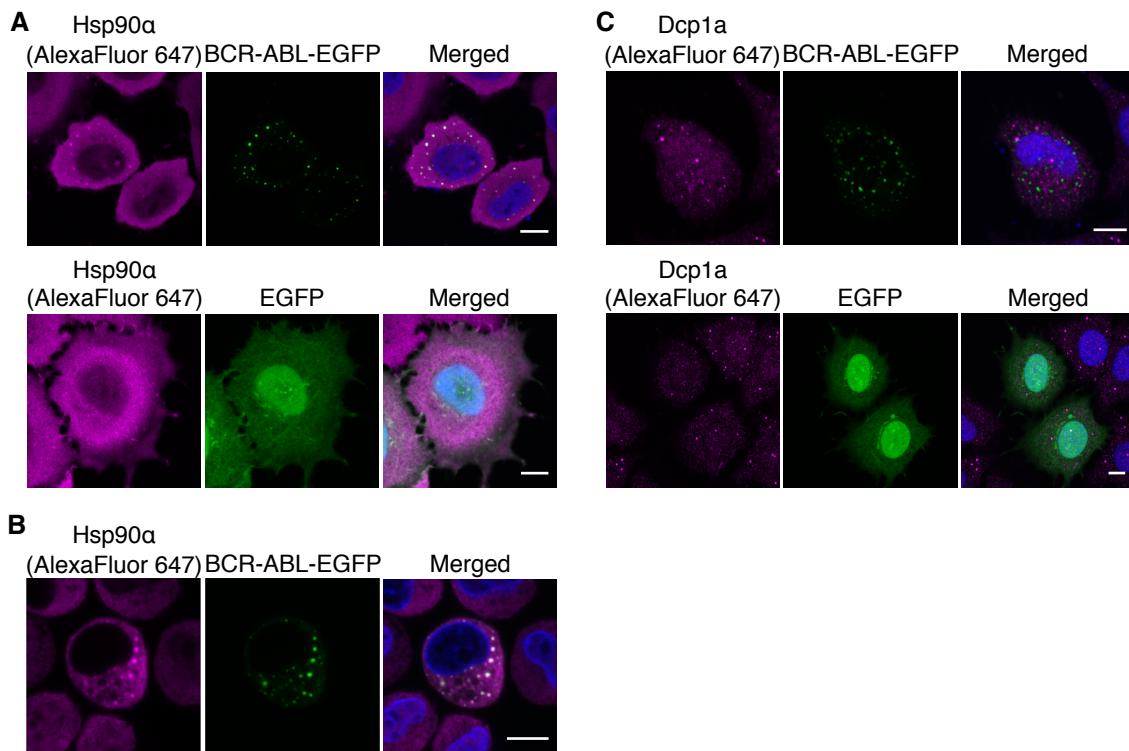


図 19 : BCR-ABL 顆粒はストレス顆粒の構成要素と共局在する

- A) HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP もしくは EGFP (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に固定し、抗 Hsp90α 抗体 (マゼンタ) を用いて蛍光免疫法を行った。核を Hoechst 33342 (青) で染色し、共焦点顕微鏡で撮影した。(Bar = 10 μm)
- B) K562 細胞に BCR-ABL-EGFP (緑) を発現させ、B と同様に免疫染色と核染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- C) HeLa 細胞に BCR-ABL-EGFP もしくは EGFP (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に固定し、抗 Dcp1a 抗体 (マゼンタ) を用いて蛍光免疫法を行った。核を Hoechst 33342 (青) で染色し、共焦点顕微鏡で撮影した。(Bar = 10 μm)

BCR-ABL のキナーゼ活性はストレス顆粒形成に必要である

キナーゼ活性を欠失する変異 (K1176R) を有する BCR-ABL は顆粒状構造を形成しないことが報告されている (Skourides et al., 1999)。さらに、BCR-ABL と同様に染色体の相互転座によって生じる癌原性の融合タンパク質 NPM-ALK においても、ALK キナーゼ活性に依存する顆粒形成が報告されている (Fawal et al., 2006, 2011)。そこでチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib を用い、BCR-ABL のキナーゼ活性を抑制した条件下での細胞内局在を検証した。K562、Ku812、TOM-1 細胞において内在性 BCR-ABL による顆粒状構造の数を定量化したところ、imatinib を処理した細胞では未処理の細胞と比較して顆粒の数が減少した (図 20)。次に、キナーゼ活性と顆粒形成の関係をより詳細に検証するため、imatinib 存在下での両者の動態を生細胞で観察した。生細胞での BCR-ABL キナーゼ活性を可視化する手段として、当研究室で開発および改良した FRET バイオセンサー Pickles 2.34 を用いた (Horiguchi et al., 2017; Mizutani et al., 2010)。K562 細胞に BCR-ABL-EGFP もしくは Pickles 2.34 を導入し、Imatinib 存在下で生細胞イメージングを行ったところ、キナーゼ活性は imatinib 添加後すみやかに低下した。それに遅れて BCR-ABL 顆粒の消失が認められた (図 21A、B)。以上の結果から、BCR-ABL のキナーゼ活性を阻害すると BCR-ABL による顆粒状構造の形成が妨げられることが示された。

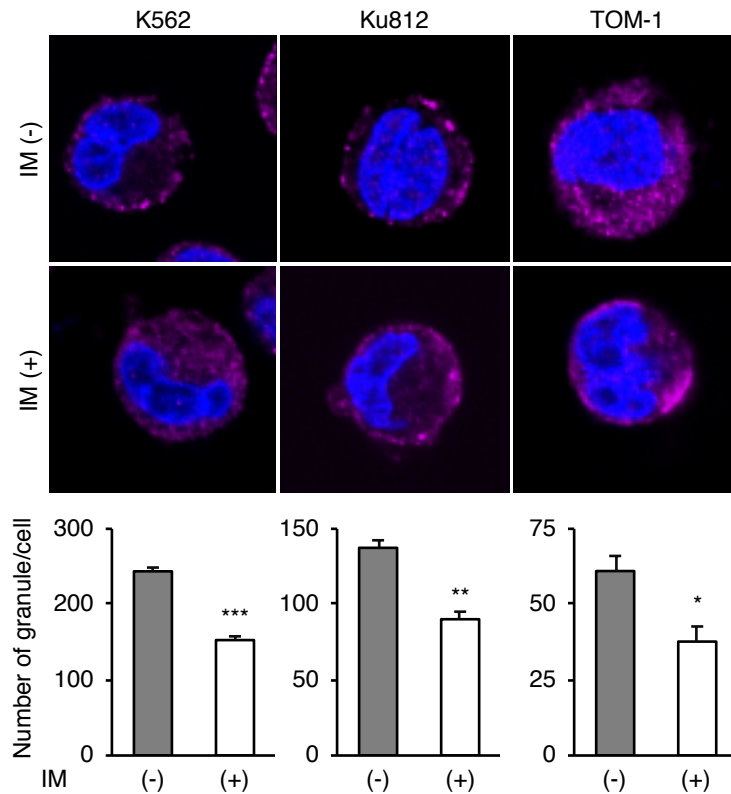


図 20 : BCR-ABL 顆粒の形成は imatinib によって抑制される

K562、Ku812 および TOM-1 細胞を、2 μ M の imatinib 存在下[IM (+)]、もしくは非存在下[IM (-)]で 6 時間培養した。細胞を固定し、抗 c-Abl 抗体で蛍光免疫法を行った (マゼンタ)。核を Hoechst 33342 で染色し (青)、共焦点顕微鏡で撮影した (Bar = 10 μ m)。図 17A と同様に 1 細胞あたりの顆粒数を定量したグラフを下に示す (K562:n $\geq$ 50、Ku812:n $\geq$ 42、TOM-1:n $\geq$ 32)。

*** : $p < 0.0001$ 、** : $p < 0.001$ 、* : $p < 0.05$ (Student's t -test)。

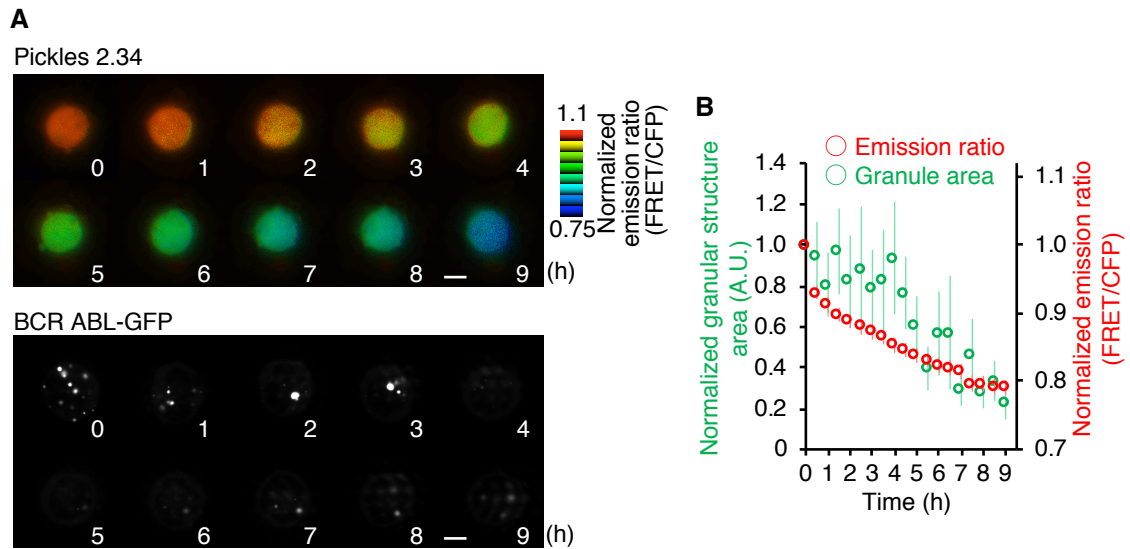


図 21 : BCR-ABL 顆粒はキナーゼ活性の低下に伴って消失する

- A) K562 細胞に Pickles 2.34 (上段) もしくは BCR-ABL-EGFP (下段) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した。蛍光顕微鏡でタイムラプス観察を行い、撮影開始時 (0 h) に終濃度 2 μ M になるように imatinib を加えた。上段の疑似カラーレシオ表示には、蛍光強度比 (FRET/CFP) を ECFP の蛍光強度で標準化した intensity-modulated display 表示を用いた。この表示方法では蛍光強度比の高低を赤から青までの 8 色で表現する。また同じ蛍光強度比を持つピクセルでも、ECFP の蛍光強度が高いほど明るく表示される (Bar = 10 μ m)。
- B) A のデータから蛍光強度比 (赤) および 1 細胞あたりの顆粒の合計面積 (緑) を、経時的に定量した。4 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 22$)。

BCR-ABL の N 末端ドメインが顆粒形成に必要である

ABL1 は主に細胞質に局在するが、顆粒の形成は報告されていない(Wetzler et al., 1993)。このため、融合タンパク質である BCR-ABL が細胞質で顆粒を形成するためには ABL キナーゼ活性の他にも、BCR もしくは BCR と ABL の結合部に存在する領域の関与が必要であると考えられる。そこで顆粒形成に関わるドメインを決定するため、BCR-ABL の各ドメインのトランケーション変異体を Venus 標識で可視化したコンストラクトを作製し、その局在を HeLa 細胞で調べた (図 22A)。その結果、作製した変異体のうち BCR の N 末端の CC ドメインを含む BCR-fr1 のみが顆粒を形成した。Venus-BCR-fr1 の顆粒構造は HeLa 細胞以外の非血球系細胞および Ph¹ 陽性細胞株の両方で認められた (図 22B)。さらに、BCR の N 末端領域を欠失した BCR-ABL (BCR-ABL- Δ N) を作製し、Venus で標識したところ、顆粒構造は形成されず細胞質全体にびまん性に局在した (図 22C)。なお、BCR-fr1 以外のトランケーション変異体は細胞質もしくは核にびまん性に局在した (図 22A)。以上から、N 末端に存在する CC ドメインが顆粒形成に関わることが示された。

前項で示したように、BCR-ABL の顆粒形成は ABL キナーゼ活性を必要とするため、キナーゼドメインを欠く BCR-fr1 により形成された顆粒の性質をより詳細に検証した。Venus-BCR-fr1 を発現した Ph¹ 陽性細胞株および非血球系細胞を固定し、Hsp90 α 抗体による免疫蛍光染色を行った後に、共焦点顕微鏡で観察した。BCR-fr1 の形成する顆粒は Hsp90 α が形成する顆粒との共局在を認められなかった (図 23A)。さらに、imatinib 存在下での生細胞イメージングでも、BCR-fr1 の形成する顆粒の消失は認められなかった (図 23B、C)。全長の BCR-ABL と BCR-fr1 を共発現させたところ、両者は同じ顆粒構造に共局在したが、Hsp90 α とは共局在しなかった (図 23D)。これらの結果から、BCR の N 末端領域は顆粒形成能を有しているが、その顆粒は Hsp90 α との共局在や imatinib による顆粒の消失を認めず、BCR-ABL 全長が形成する顆粒とは異なる生化学的性質を持つことが示された。

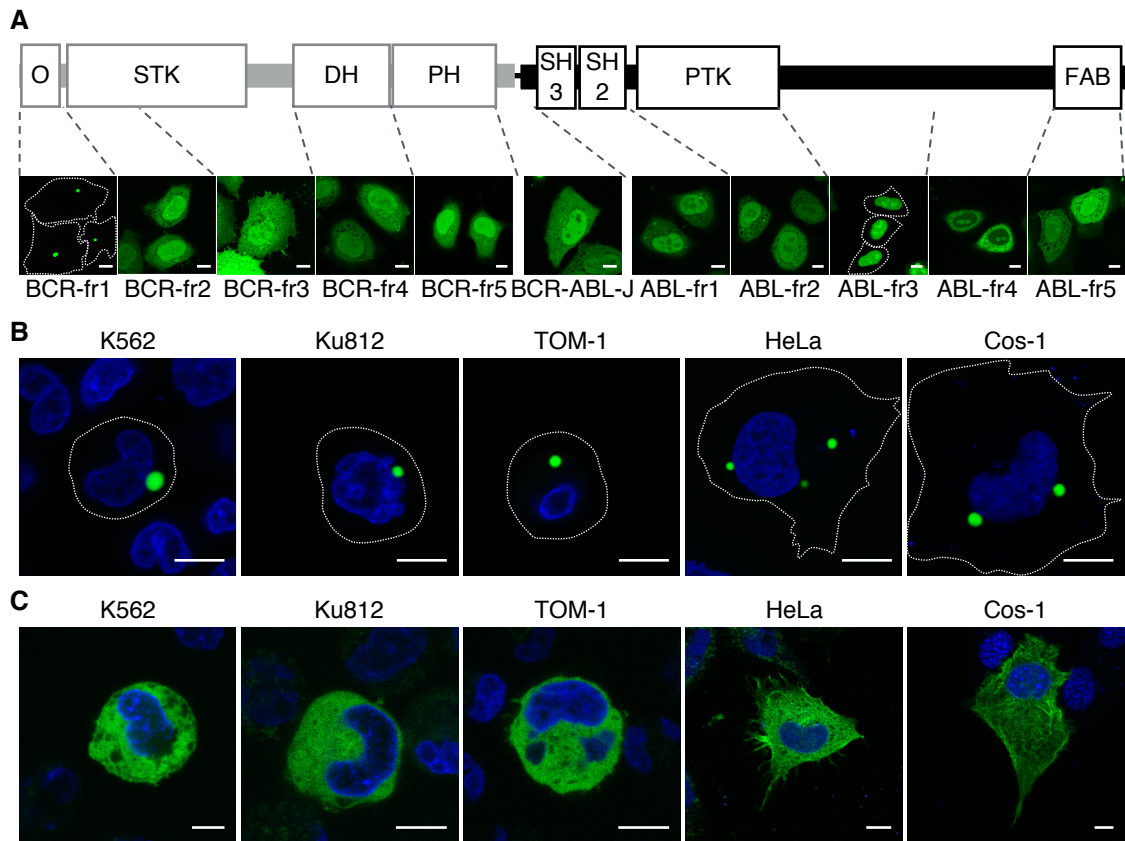


図 22 : BCR-ABL の N 末端領域が顆粒形成に必要である

- A) 模式図は BCR-ABL の配列における各ドメインの局在を示す (O : oligomerization、STK : serine/threonine kinase、DH : Dbl homology、PH : pleckstrin homology、SH : Src homology、PTK : protein tyrosine kinase、FAB : F-actin binding)。点線に対応を示した画像は、HeLa 細胞に Venus で標識したトランケーション変異体の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に固定し、共焦点顕微鏡で観察したものである。(Bar = 10 μm)
- B) K562、Ku812、TOM-1、HeLa および Cos-1 細胞に Venus-BCR-fr1 (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に固定した。核を Hoechst 33342 (青) で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- C) K562、Ku812、TOM-1、HeLa および Cos-1 細胞に BCR-ABL-ΔN-Venus (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に固定した。核を Hoechst 33342 (青) で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)

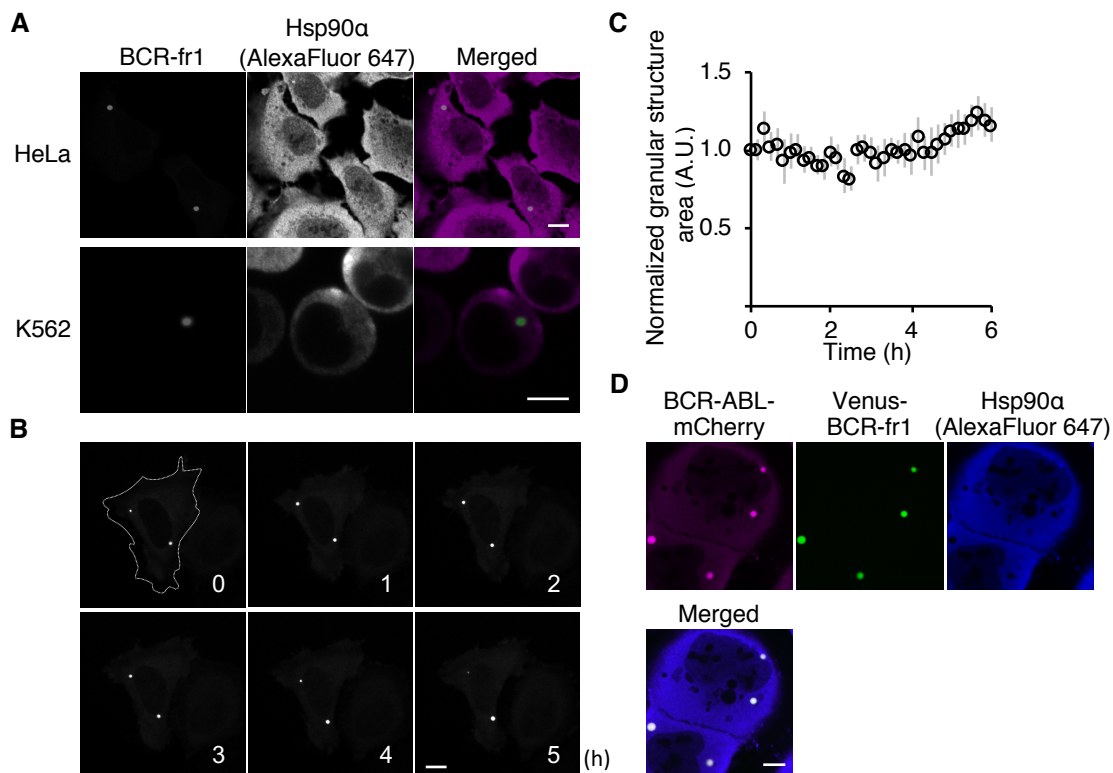


図 23 : BCR-fr1 が形成する顆粒は BCR-ABL 顆粒とは含まれるタンパク質や imatinib への反応性が異なる

- A) HeLa および K562 細胞に Venus-BCR-fr1 (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間後に固定した。抗 Hsp90 α 抗体 (マゼンタ) で蛍光免疫法を行った。(Bar = 10 μ m)
- B) HeLa 細胞に Venus-BCR-fr1 の発現ベクターを導入し、24 時間後に共焦点顕微鏡で観察した。撮影開始時 (0 h) に終濃度 2 μ M になるように imatinib を加えた。点線は 1 細胞の領域を表す。(Bar = 10 μ m)
- C) B のデータから 1 細胞あたりの顆粒の合計面積を経時的に定量した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 10$)。
- D) HeLa 細胞に BCR-ABL-mCherry (マゼンタ) および Venus-BCR-fr1 (緑) の発現ベクターを導入し、24 時間後に固定した。抗 Hsp90 α 抗体 (青) で蛍光免疫法を行った。(Bar = 10 μ m)

BCR-ABL の細胞質での顆粒形成は Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性の増殖に重要である

前項において BCR-ABL の顆粒形成に関与することが示された BCR の CC ドメインは、前述の通り BCR-ABL のホモ四量体形成にも関与する (Maru and Witte, 1991; McWhirter et al., 1993; Pendergast et al., 1991)。そこで、BCR-ABL の多量体化が顆粒形成に影響するか検証するため、赤色蛍光タンパク質 DsRed を用いて CC ドメインの四量体形成能を模倣した。DsRed は蛍光発色団の形成に四量体の形成を必要とするため、四量体の形成を蛍光観察で確認することが可能である (Sacchetti et al., 2002)。作製したコンストラクト (DsRed-BCR-ABL、DsRed-BCR-ABL- Δ N) はいずれも K562 細胞において蛍光を認め、四量体形成が確認された (図 24A)。DsRed-BCR-ABL は顆粒状構造を示したのに対し、DsRed-BCR-ABL- Δ N は細胞質にびまん性に局在し、顆粒の形成を認めなかった。DsRed の改変体である単量体蛍光タンパク質 mCherry と BCR-ABL- Δ N の融合タンパク質も同様に細胞質局在を示した (図 24A)。以上の結果から、BCR-ABL の四量体化は顆粒形成に必須ではないことが示された。

最後に、BCR-ABL 顆粒の形成が BCR-ABL による形質転換に関与するか否かを、マウスリンパ球細胞株である Ba/F3 細胞を用いた増殖アッセイを用いて評価した。Ba/F3 細胞はその増殖に IL-3 を必要とし、IL-3 を欠く培地で培養すると増殖は抑制され、やがて細胞死に至る (Mathey-Prevot et al., 1986)。この細胞株を用いて DsRed、DsRed-BCR-ABL、DsRed-BCR-ABL- Δ N、および mCherry-BCR-ABL- Δ N を安定的に発現する細胞株を作製した。IL-3 不含 RPMI 1640 培地で培養すると、DsRed-BCR-ABL 発現細胞では増殖が認められたのに対し、mCherry-BCR-ABL- Δ N 発現細胞では増殖能が有意に抑制された (図 25)。さらに、DsRed-BCR-ABL- Δ N 発現細胞でもこの傾向は変わらなかった (図 25)。BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞と DsRed-BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞とで細胞の生存能に差がなかったことから、DsRed 標識による増殖能への悪影響は無いものと考えられる (図 24B)。また、安定発現株から得られた細胞可溶化液を抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析により、細胞内のチロシンリン酸化レベルを評価した。DsRed 発現細胞と比較して、DsRed-BCR-ABL 発現細胞および DsRed-BCR-ABL- Δ N 発現細胞ではチロシンリン酸化の亢進が認められた。一方、mCherry-BCR-ABL- Δ N 発現細胞ではリン酸化の亢進が認められなかった (図 24C)。すなわち、CC ドメインを欠損した BCR-ABL であっても DsRed 標

識で四量体化形成を模倣することによりチロシンキナーゼ活性が亢進することが確認された。DsRed-BCR-ABL- Δ N は、四量体形成を介してキナーゼ活性が亢進するが、顆粒形成せず、Ba/F3 細胞において IL-3 非依存性の細胞増殖を誘導できなかった。以上から、BCR-ABL のストレス顆粒への局在が悪性形質転換にとって重要であることが示された。

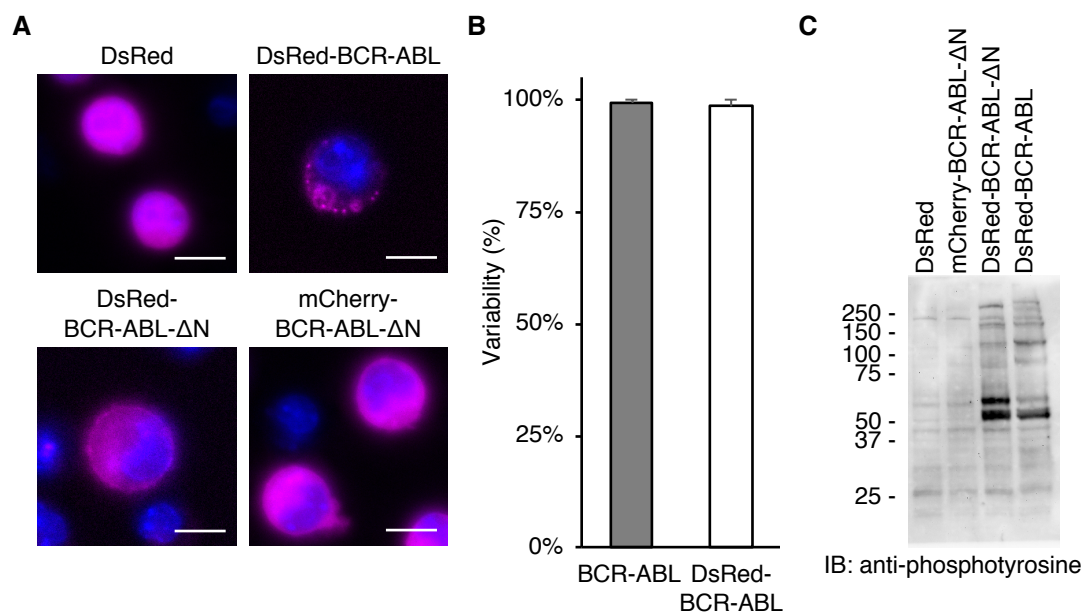


図 24 : DsRed-BCR-ABL- Δ N は四量体化するが顆粒を形成しない

- A) DsRed、DsRed-BCR-ABL、DsRed-BCR-ABL- Δ N および mCherry-BCR-ABL- Δ N (マゼンタ) を安定発現する Ba/F3 細胞を Hoechst 33342 (青) で核染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- B) Ba/F3 細胞に BCR-ABL もしくは DsRed-BCR-ABL を発現させ、48 時間後に LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain で死細胞を染色し、固定した。抗 c-Abl 抗体で蛍光免疫法を行い、BCR-ABL もしくは DsRed-BCR-ABL 発現細胞を同定し、LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain の蛍光強度によって生細胞と死細胞を判別した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 $\pm$ 標準誤差を示す ($n \geq 85$)。2 群間に有意差は認められなかった (Student's t -test)。
- C) DsRed、DsRed-BCR-ABL、DsRed-BCR-ABL- Δ N および mCherry-BCR-ABL- Δ N を安定発現する Ba/F3 細胞から細胞可溶化液を抽出し、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットを行った。左の数字は分子量マーカー[kDa]の位置を示す。

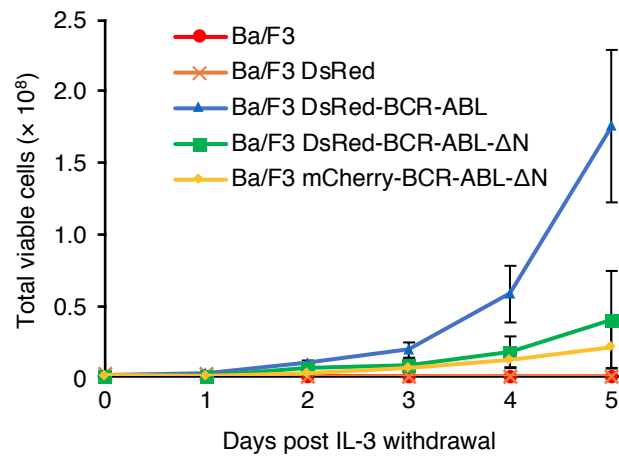


図 25 : BCR-ABL の顆粒形成は Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性の増殖に重要である

Ba/F3 細胞 (赤)、および DsRed (オレンジ)、DsRed-BCR-ABL (青)、DsRed-BCR-ABL-ΔN (緑)、mCherry-BCR-ABL-ΔN (黄) を安定発現する Ba/F3 細胞を計数し、 1.0×10^6 細胞を IL-3 不含 RPMI 1640 培地 10 ml 中で 6 日間培養した。1 日ごとにトリパンブルー染色により死細胞を判定し、生細胞のみを計数した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 ± 標準誤差を示す。

【考察】

本研究では、BCR-ABL が細胞質に顆粒形成することを明らかにするとともに、その性質および、顆粒形成と造腫瘍能との関連を検証した。BCR-ABL が形成する顆粒は、メンブレンレスオルガネラであるストレス顆粒であることが同定された。また、BCR-ABL による顆粒形成は ABL キナーゼ活性および BCR の N 末端領域が必要であった。BCR-ABL が細胞質中に顆粒状構造を形成することは以前から報告されていたが、その細胞内局在については明確な結論が出されておらず、本研究によってはじめて明らかにされた。

BCR-ABL の形成する顆粒はストレス顆粒の性質を示したが、その形成機構は今後詳細に調べる必要がある。通常、核小体やストレス顆粒、P-body などの細胞内の凝集は液-液相分離によって形成される。液-液相分離を起こす分子の条件は、複数の分子内・分子間相互作用を生じるドメインを有することであり、その条件を満たす特徴的な構造の一つが、天然変性領域 (intrinsically disordered region, IDR) である (Banani et al., 2017)。IDR は安定した構造を持たないために弱い相互作用を複数形成する性質があり、この性質によって相分離を起こす。BCR-ABL は変性領域の予測プログラム IUPred によって、BCR (1-417 aa) および ABL (1392-1916 aa) の配列内に IDR が存在することが予想され、顆粒形成を制御している可能性がある (Maru, 2012)。また、BCR の N 末端領域には ABL キナーゼ活性により自己リン酸化されるチロシン残基 (Y177) が存在し、このリン酸化した Y177 には Grb2 が結合する。さらに Grb2 の分子内には複数の相互作用ドメインがあり、実際にシグナル分子の相分離を起こすことを考慮すると、BCR-ABL による顆粒形成には Y177 のリン酸化が関与する可能性も考えられる (Su et al., 2016)。

本研究で認められた BCR-ABL による顆粒形成と類似した現象が、未分化大細胞型リンパ腫の原因遺伝子がコードするキメラタンパク質 NPM-ALK でも認められることが報告されている (Fawal et al., 2006; Honorat et al., 2006)。NPM-ALK もまた、ALK キナーゼ活性に依存して細胞質の顆粒構造に局在すること、および NPM は複数の相互作用ドメインを介したタンパク質-タンパク質間相互作用により、相分離を生じさせる (Banani et al., 2017)。NPM-ALK 顆粒は既知の P-body やストレス顆粒のマーカーとは局在が一致しない新たな RNA 顆粒であるとされているが、その形成が造腫瘍能に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。

核小体やストレス顆粒、P-body などのメンブレンレスオルガネラは相分離によって、細胞内の局所に特定のタンパク質や核酸を集合させ、他の分子を排除した環境を作り出している。凝集の形成により基質分子と酵素分子を近接させて反応特異性を向上する、あるいは基質ないし酵素分子を隔離することで反応を抑制することにより、様々な細胞内プロセス（RNA 代謝、リボソーム生合成、DNA 損傷応答、シグナル伝達など）に関わっている。例えば DEAD-box ヘリカーゼである Ded1 は、ストレス顆粒の構成要素であり、ストレス顆粒形成を促進することにより mRNA をストレス顆粒内に隔離し、翻訳を抑制する (Hilliker et al., 2011)。また、Wnt シグナルの伝達に関与する Dishevelled 2 (Dvl2) は細胞内で液-液相分離による顆粒を形成する。顆粒形成能を欠損した変異型 Dvl2 には Wnt シグナルに対し優性阻害効果が見られることから、Dvl2 による顆粒形成が Wnt シグナル活性化に必須であると考えられている (Schwarz-Romond et al., 2007)。BCR-ABL 顆粒は、RNA 代謝に影響を与える、あるいは顆粒から発信される BCR-ABL シグナルによって増殖能獲得に関与することが予想される。実際に、CML 細胞株においては BCR-ABL 依存的にストレス顆粒が形成され、それによってがん抑制遺伝子である breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) の発現が抑制される (Podsiwylow-Bartnicka et al., 2014)。このことから、BCR-ABL は顆粒形成によりがん抑制遺伝子の mRNA を顆粒内に隔離し、その翻訳を抑制する可能性が考えられる。また、BCR-ABL が局在する細胞内顆粒には、様々な下流のシグナル分子 (Grb2、PI3K p85 サブユニット、SHC-transforming protein 1、E3 ubiquitin-protein ligase Cbl、Crk-like protein (CrkL)) が局在する (Skourides et al., 1999)。なかでも、BCR-ABL の基質としてがん化に関与する CrkL は顆粒においてリン酸化されることが分かっている (Patel et al., 2008)。以上から、BCR-ABL は顆粒形成によりキナーゼとその基質を顆粒内に集中させ、リン酸化反応を効率よく起こすことでがん化を促進する可能性が考えられる。

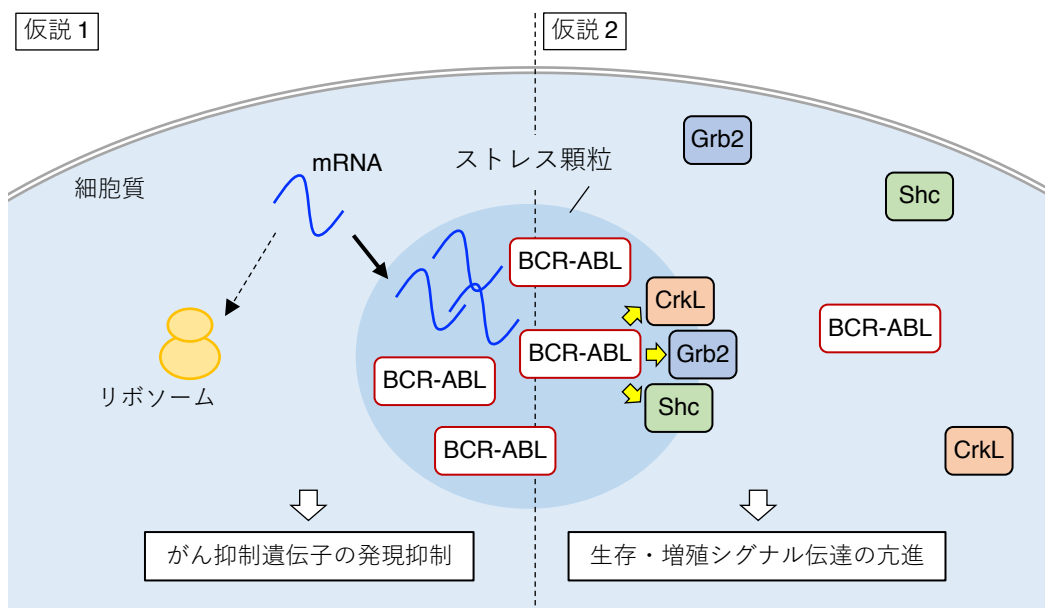


図 26 : BCR-ABL によるストレス顆粒の形成は増殖能獲得に関与する

仮説 1 (左) : BCR-ABL はストレス顆粒を形成することにより mRNA を顆粒内に隔離し、細胞質のリボソームへのアクセスを妨げることにより翻訳を抑制する。がん抑制遺伝子をコードする mRNA であった場合には細胞のがん化が引き起こされる。仮説 2 (右) : BCR-ABL はストレス顆粒の形成によって下流のシグナル伝達分子を局所に集めることで、効率よく生存・増殖シグナルを伝達する。

【総括および結論】

第 1 章

1. 80 種類を超えるオルガネラマーカーを作製し、大部分のオルガネラマーカーが目的のオルガネラに局在することを確認した。
2. ミトコンドリアマトリックスマーカーにフォールディング効率の向上した蛍光タンパク質を用いると、細胞質や核へのミスローカライゼーションが誘発された。
3. avGFP 由来の pH センサー pHluorin にフォールディング変異を野生型 avGFP と同じアミノ酸に戻す復帰変異を導入すると、ミトコンドリアマーカーのミスローカライゼーションが抑制された。
4. 改変した pH センサー *at* pHluorin の蛍光強度の変化はミトコンドリアマトリックス内 pH 変化を pHluorin よりも正確に反映した。

第 2 章

1. BCR-ABL が細胞質に形成する顆粒はストレス顆粒であることを同定した。
2. BCR-ABL の顆粒形成にはキナーゼ活性および N 末端領域の配列が重要であった。
3. 顆粒を形成しない変異型 BCR-ABL はマウス IL-3 依存性 pro-B 細胞株 Ba/F3 細胞に IL-3 非依存性の細胞増殖を誘導できなかった。

【新知見の意義・今後の展望】

第 1 章では、蛍光タンパク質のフォールディング効率の向上が、オルガネラマーカーのミスローカライゼーションを誘発する要因であることを示した。これまで、フォールディング促進変異は蛍光タンパク質が光り始めるまでの時間が短縮するというメリットがあるため、積極的に導入されてきた。今後は他のオルガネラマーカーやオルガネラ局在型バイオセンサー作製の際には蛍光タンパク質の性質を十分に理解し、その導入の是非を検討する必要がある。以上から、本研究成果により、定量的蛍光イメージングを行ううえで、重要な知見が得られたと考えられる。

第 2 章では、BCR-ABL が細胞質において顆粒を形成することを見出し、その構造がストレス顆粒であることを明らかにした。BCR-ABL による顆粒形成は

BCR-ABL キナーゼ活性と N 末端領域の配列を必要とした。今後は、CML のマウスモデルにおいても BCR-ABL が顆粒を形成するか検証し、in vivo でも顆粒形成が増殖能の獲得に関与するか明らかにしたい。さらに患者検体を用いて BCR-ABL 顆粒の有無と予後の相関を調べ、CML の慢性期で見られる分化能を保持した白血球の過剰増殖や、急性転化期での分化能の喪失を伴う著しい増殖といった CML の各病態において BCR-ABL による顆粒形成がどのように関与するかを明らかにすることも重要である。将来的には、BCR-ABL の顆粒形成を標的とした新しい概念に基づく CML 治療開発への基盤構築を行いたい。具体的には、顆粒の形成を妨げる薬剤を蛍光観察によってスクリーニングし、CML に対する治療効果を培養細胞系およびマウス CML モデルで検証する。また、BCR-ABL 顆粒の形成やそれによる増殖能獲得のより詳細なメカニズムについても、部位特異的変異導入やトランケーション変異体の作製によって詳細に検証していきたい。

本研究では蛍光観察での定量解析に資するツールを作製した。また、BCR-ABL のシグナル伝達の時空間的制御機構を解析し、顆粒形成が増殖能の獲得に関与することを示した。今後も定量的イメージングにより細胞の生理・病理的現象を解析し、メカニズムを明らかにするとともに新たな治療法の開発へと繋げていきたい。

【謝辞】

生細胞における様々な現象を目で見て理解することの魅力を教えていただき、また本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり多くのご支援とご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室の教授大場雄介先生に深謝いたします。また、大場先生とともに基礎配属および MD-PhD コースの 4 年間、実験や研究発表の手法、科学的な考え方や見方について基礎から丁寧にご指導を戴きました北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室の講師藤岡容一郎先生に深くお礼申し上げます。北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室学術研究員の佐藤絢氏、同細胞生理学教室 OB の堀内浩水氏（現北海道大学大学力強化推進本部研究推進 URA）には博士課程の先輩として、実験の進め方についていつも親身に相談に乗っていただき、有益なご助言を戴きました。ここに深くお礼申し上げます。日頃より研究における多大なご協力とご支援を戴きました教室員の皆様に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、公益財団法人武田科学振興財団には医学部博士課程奨学助成に選出していただき、ご支援を戴きましたことを重ねてお礼申し上げます。

最後に、研究の道に進む私を応援し、暖かく見守り、支えてくれた家族に心より感謝いたします。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

- Aliye, N., Fabbretti, A., Lupidi, G., Tsekoa, T., and Spurio, R. (2015). Engineering color variants of green fluorescent protein (GFP) for thermostability, pH-sensitivity, and improved folding kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 1205–1216.
- An, W.G., Schulte, T.W., and Neckers, L.M. (2000). The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210^{bcr-abl} and v-src proteins before their degradation by the proteasome. *Cell Growth Differ.* *11*, 355–360.
- Archer, S.L. (2013). Mitochondrial dynamics — mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2236–2251.
- Aw, T.Y., and Jones, D.P. (1989). Heterogeneity of pH in the aqueous cytoplasm of renal proximal tubule cells. *FASEB J.* *3*, 52–58.
- Bajar, B.T., Wang, E.S., Lam, A.J., Kim, B.B., Jacobs, C.L., Howe, E.S., Davidson, M.W., Lin, M.Z., and Chu, J. (2016). Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci. Rep.* *6*, 1–12.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 285–298.
- Di Benedetto, G., Scalzotto, E., Mongillo, M., and Pozzan, T. (2013). Mitochondrial Ca²⁺ uptake induces cyclic AMP denervation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab.* *17*, 965–975.
- Berezhnov, A. V., Soutar, M.P.M., Fedotova, E.I., Frolova, M.S., Plun-Favreau, H., Zinchenko, V.P., and Abramov, A.Y. (2016). Intracellular pH modulates

autophagy and mitophagy. *J. Biol. Chem.* *291*, 8701–8708.

Bömer, U., Meijer, M., Guiard, B., Dietmeier, K., Pfanner, N., and Rassow, J. (1997). The sorting route of cytochrome *b2* branches from the general mitochondrial import pathway at the preprotein translocase of the inner membrane. *J. Biol. Chem.* *272*, 30439–30446.

Cano Abad, M.F., Di Benedetto, G., Magalhães, P.J., Filippin, L., and Pozzan, T. (2004). Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *J. Biol. Chem.* *279*, 11521–11529.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.

Chudakov, D.M., Matz, M. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* *90*, 1103–1163.

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{*bcr/abl*} gene of the Philadelphia chromosome. *Science* *247*, 824–830.

Day, R.N., and Davidson, M.W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* *38*, 2887–2921.

DeLean, A., Munson, P.J., and Rodbard, D. (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol. Metab.* *235*, E97-102.

DiPilato, L.M., Cheng, X., and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within

discrete subcellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 16513–16518.

Dittmer, P.J., Miranda, J.G., Gorski, J.A., and Palmer, A.E. (2009). Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc. *J. Biol. Chem.* *284*, 16289–16297.

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nat. Med.* *2*, 561–566.

Druker, B.J., O'Brien, S.G., Cortes, J., and Radich, J. (2002). Chronic myelogenous leukemia. *Hematology* *2002*, 111–135.

Eilers, M., and Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* *322*, 228–232.

Fawal, M., Armstrong, F., Ollier, S., Dupont, H., Touriol, C., Monsarrat, B., Delsol, G., Payrastre, B., and Morello, D. (2006). A “liaison dangereuse” between AUF1/hnRNP and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. *Blood* *108*, 2780–2788.

Fawal, M., Jean-Jean, O., Vanzo, N., and Morello, D. (2011). Novel mRNA-containing cytoplasmic granules in ALK-transformed cells. *Mol. Biol. Cell* *22*, 726–735.

Filonov, G.S., Piatkevich, K.D., Ting, L.-M., Zhang, J., Kim, K., and Verkhusha, V. V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* *29*, 757–761.

Fujioka, Y., Tsuda, M., Hattori, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Miyazaki, T., and Ohba,

Y. (2011). The Ras–PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One* *6*, e16324.

Fujioka, Y., Nishide, S., Ose, T., Suzuki, T., Kato, I., Fukuhara, H., Fujioka, M., Horiuchi, K., Satoh, A.O., Nepal, P., et al. (2018). A sialylated voltage-dependent Ca^{2+} channel binds hemagglutinin and mediates influenza A virus entry into mammalian cells. *Cell Host Microbe* *23*, 809-818.e5.

Fujioka, Y., Satoh, A.O., Horiuchi, K., Fujioka, M., Tsutsumi, K., Sasaki, J., Nepal, P., Kashiwagi, S., Paudel, S., Nishide, S., et al. (2019). A Peptide Derived from Phosphoinositide 3-kinase Inhibits Endocytosis and Influenza Virus Infection. *Cell Struct. Funct.* *44*, 61–74.

Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 29188–29194.

Gross, A.W., Zhang, X., and Ren, R. (1999). Bcr-Abl with an SH3 deletion retains the ability to induce a myeloproliferative disease in mice, yet c-Abl activated by an SH3 deletion induces only lymphoid malignancy. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6918–6928.

Hanson, G.T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* *279*, 13044–13053.

He, Y., Wertheim, J.A., Xu, L., Miller, J.P., Karnell, F.G., Choi, J.K., Ren, R., and Pear, W.S. (2002). The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood* *99*, 2957–2968.

Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 12501–12504.

Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* *373*, 663–664.

Hilliker, A., Gao, Z., Jankowsky, E., and Parker, R. (2011). The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex. *Mol. Cell* *43*, 962–972.

Honorat, J.F., Ragab, A., Lamant, L., Delsol, G., and Ragab-Thomas, J. (2006). SHP1 tyrosine phosphatase negatively regulates NPM-ALK tyrosine kinase signaling. *Blood* *107*, 4130–4138.

Horiguchi, M., Fujioka, M., Kondo, T., Fujioka, Y., Li, X., Horiuchi, K., Satoh, A.O., Nepal, P., Nishide, S., Nanbo, A., et al. (2017). Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Struct. Funct.* *42*, 15–26.

Iannetti, E.F., Smeitink, J.A.M., Beyrath, J., Willems, P.H.G.M., and Koopman, W.J.H. (2016). Multiplexed high-content analysis of mitochondrial morphofunction using live-cell microscopy. *Nat. Protoc.* *11*, 1693–1710.

Lakadamyali, M., Rust, M.J., and Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* *124*, 997–1009.

Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown, M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., et al. (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* *9*, 1005–1012.

Maru, Y. (2012). Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Cancer Sci.* *103*, 1601–1610.

Maru, Y., and Witte, O.N. (1991). The *BCR* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* *67*, 459–468.

Mathey-Prevot, B., Nabel, G., Palacios, R., and Baltimore, D. (1986). Abelson virus abrogation of interleukin-3 dependence in a lymphoid cell line. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 4133–4135.

Matsumoto, K., Minami, M., Shinozaki, F., Suzuki, Y., Abe, K., Zenno, S., Matsumoto, S., and Minami, Y. (2011). Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *407*, 720–724.

McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 7587–7595.

Mena, M.A., Treynor, T.P., Mayo, S.L., and Daugherty, P.S. (2006). Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1569–1571.

De Michele, R., Carimi, F., and Frommer, W.B. (2014). Mitochondrial biosensors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *48*, 39–44.

Miroshnychenko, D., Dubrovskaya, A., Maliuta, S., Teleguev, G., and Aspenström, P. (2010). 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.

Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G₁-S regulates cyclin E buildup

and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 11960–11965.

Mizutani, T., Kondo, T., Darmanin, S., Tsuda, M., Tanaka, S., Tobiume, M., Asaka, M., and Ohba, Y. (2010). A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. *Clin. Cancer Res.* *16*, 3964–3975.

Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., and Weil, D. (2008). Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4469–4479.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* *20*, 87–90.

Okabe, M., Matsushima, S., Morioka, M., Kobayashi, M., Abe, S., Sakurada, K., Kakinuma, M., and Miyazaki, T. (1987). Establishment and characterization of a cell line, TOM-1, derived from a patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Blood* *69*, 990–998.

Okabe, M., Kunieda, Y., Itaya, T., Kurosawa, M., Sakurada, K., Miyazaki, T., Higa, T., Kasai, M., Kodama, S., Maekawa, I., et al. (1994). Establishment and characterization of a new Ph1 positive ALL cell line (ALL/MIK) presenting bcr gene rearrangement on bcr-2 and ALL-Type *bcr/abl* transcript: Suggestion of *in vitro* differentiation to monocytoid lineage. *Leuk. Lymphoma* *12*, 287–296.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* *273*, 1392–1395.

Palmer, A.E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S.A., Lev-Ram, V., Baker, D., and Tsien, R.Y. (2006). Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned

calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol.* *13*, 521–530.

Pare, J.M., Tahbaz, N., López-Orozco, J., LaPointe, P., Lasko, P., and Hobman, T.C. (2009). Hsp90 regulates the function of Argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3273–3284.

Pastukh, V., Shokolenko, I.N., Wilson, G.L., and Alexeyev, M.F. (2008). Mutations in the passenger polypeptide can affect its partitioning between mitochondria and cytoplasm: Mutations can impair the mitochondrial import of DsRed. *Mol. Biol. Rep.* *35*, 215–223.

Patel, H., Marley, S.B., Greener, L., and Gordon, M.Y. (2008). Subcellular distribution of p210^{BCR-ABL} in CML cell lines and primary CD34⁺ CML cells. *Leukemia* *22*, 559–571.

Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* *24*, 79–88.

Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y., and Witte, O.N. (1991). BCR sequences essential for transformation by the *BCR-ABL* oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* *66*, 161–171.

Perez-Jimenez, R., Garcia-Manyes, S., Ainaravapu, S.R.K., and Fernandez, J.M. (2006). Mechanical unfolding pathways of the enhanced yellow fluorescent protein revealed by single molecule force spectroscopy. *J. Biol. Chem.* *281*, 40010–40014.

Pfanner, N., and Truscott, K.N. (2002). Powering mitochondrial protein import. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 234–236.

Podszywalow-Bartnicka, P., Wolczyk, M., Kusio-Kobialka, M., Wolanin, K., Skowronek, K., Nieborowska-Skorska, M., Dasgupta, Y., Skorski, T., and Piwocka, K. (2014). Downregulation of BRCA1 protein in BCR-ABL1 leukemia cells depends on stress-triggered TIAR-mediated suppression of translation. *Cell Cycle* 13, 3727–3741.

Posselt, G., Wiesauer, M., Chichirau, B.E., Engler, D., Krisch, L.M., Gadermaier, G., Briza, P., Schneider, S., Boccellato, F., Meyer, T.F., et al. (2019). *Helicobacter pylori*-controlled c-Abl localization promotes cell migration and limits apoptosis. *Cell Commun. Signal.* 17, 10.

Reid, B.G., and Flynn, G.C. (1997). Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36, 6786–6791.

Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172–183.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607.

Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5, 635–642.

Sacchetti, A., Subramaniam, V., Jovin, T.M., and Alberti, S. (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett.* 525, 13–19.

Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., and Ryan, T.A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* 79, 2199–2208.

- Sato, T., Esaki, M., Fernandez, J.M., and Endo, T. (2005). Comparison of the protein-unfolding pathways between mitochondrial protein import and atomic-force microscopy measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 17999–18004.
- Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., et al. (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* *1*, 479–492.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P.J.G., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 484–492.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., and Tsien, R.Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* *5*, 545–551.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* *59*, 223–239.
- Sirvent, A., Benistant, C., and Roche, S. (2008). Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell* *100*, 617–631.
- Skourides, P.A., Perera, S.A., and Ren, R. (1999). Polarized distribution of Bcr-Abl in migrating myeloid cells and co-localization of Bcr-Abl and its target proteins. *Oncogene* *18*, 1165–1176.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* *67*, 31–40.
- Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S.,

Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* *163*, 257–269.

Su, X., Ditlev, J.A., Hui, E., Xing, W., Banjade, S., Okrut, J., King, D.S., Taunton, J., Rosen, M.K., and Vale, R.D. (2016). Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science* *352*, 595–599.

Takeuchi, M., and Ozawa, T. (2007). Methods for imaging and analyses of intracellular organelles using fluorescent and luminescent proteins. *Anal. Sci.* *23*, 25–29.

Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Desbats, M.A., Leishman, C.C., and Boccaccio, G.L. (2009). Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* *122*, 563–573.

Timpson, P., McGhee, E.J., and Anderson, K.I. (2011). Imaging molecular dynamics in vivo – from cell biology to animal models. *J. Cell Sci.* *124*, 2877–2890.

Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., and Nagai, T. (2009). An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat. Methods* *6*, 351–353.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 509–544.

Tsutsumi, K., Fujioka, Y., Tsuda, M., Kawaguchi, H., and Ohba, Y. (2009). Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cell. Signal.* *21*, 1672–1679.

Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I.M., Stepanenko, O. V., Zaraisky, A.G.,

Shavlovsky, M.M., Turoverov, K.K., and Uversky, V.N. (2003). High Stability of *Discosoma* DsRed As Compared to *Aequorea* EGFP. *Biochemistry* *42*, 7879–7884.

Wertheim, J.A., Perera, S.A., Hammer, D.A., Ren, R., Boettiger, D., and Pear, W.S. (2003). Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood* *102*, 2220–2228.

Wetzler, M., Talpaz, M., Van Etten, R.A., Hirsh-Ginsberg, C., Beran, M., and Kurzrock, R. (1993). 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.

Wienhues, U., Becker, K., Schleyer, M., Guiard, B., Tropschug, M., Horwich, A.L., Pfanner, N., and Neupert, W. (1991). Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo. *J. Cell Biol.* *115*, 1601–1609.

Wilcox, A.J., Choy, J., Bustamante, C., and Matouschek, A. (2005). Effect of protein structure on mitochondrial import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 15435–15440.

Wu, Y., Zhang, K., Seong, J., Fan, J., Chien, S., Wang, Y., and Lu, S. (2016). *In-situ* coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions. *Sci. Rep.* *6*, 29377.

Yoshida, K., and Miki, Y. (2005). Enabling death by the Abl tyrosine kinase: mechanisms for nuclear shuttling of c-Abl in response to DNA damage. *Cell Cycle* *4*, 777–779.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* *337*, 1062–1065.

Zhang, X., and Ren, R. (1998). Bcr-abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: A novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3829–3840.

Zhang, Y.Z., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., and Segal, R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-Induced survival while internalized receptors regulate NGF-Induced differentiation. *J. Neurosci.* 20, 5671–5678.

Zurek, N., Sparks, L., and Voeltz, G. (2011). Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic* 12, 28–41.