



Title	低分子化合物を用いた核内構造体の形成メカニズムに関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大峽, 咲希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15781号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92025
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Saki_Ohazama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 大峽咲希

学 位 論 文 題 名

低分子化合物を用いた核内構造体の形成メカニズムに関する研究

細胞内には脂質膜のない様々な非膜オルガネラが存在し、遺伝子発現に必要な機能を提供するための重要な場となっている。このような構造体形成の原理として、近年、構成タンパク質や RNA の多価の相互作用による液-液相分離がはたらくことが提唱されたが、個別の構造体で形成や消失が円滑に進む仕組みには不明な点が多い。本研究では核内の代表的な非膜オルガネラであるカハール体を対象として形成過程の解析を行った。カハール体はスプライシングを担う RNA-タンパク質複合体 snRNP の成熟の場であり、カハール体のマーカーとなる Coilin に加えて、snRNP を構成する snRNA やその結合タンパク質、snRNP 形成のシャペロンである SMN も集積している。細胞内では大量の snRNP 生合成が行われており、カハール体に集積した SMN は snRNP 輸送の終了後、再利用のためカハール体から効率的に離れる必要がある。なお核内では SMN は Coilin や snRNP を含まない Gem と呼ばれる輝点としても存在することが知られているが、Gem の形成過程やカハール体との関係性は不明であった。

また SMN の欠損や変異は脊髄性筋萎縮症(SMA)を引き起こし、原因変異の多くは SMN の多量体形成ドメインである YG ボックスに集中している。しかし多量体形成不全が SMN の欠損と同様の影響を及ぼすメカニズムは不明であり、疾患発症にどう関わるかも明らかになっていない。

本研究では細胞内 snRNP 量を指標としたスクリーニングから得られたカハール体に影響を与えるツール化合物を用いて、カハール体の形成・消失過程に関して 2 つの視点から詳細な解析を行い、SMN の多量体化ドメインが SMN のリサイクル過程に重要な役割を果たすとの知見を得た。

超解像顕微鏡を用いてカハール体を観察したところ、その微細構造には多様性が見られた。SMN に着目するとその輝点が多い場合、輝点はリング状に観察され構造的な特徴を持つ構造体が生じていることが示唆された。またそれは多くの場合、Coilin から分離した状態で観察された。しかしこのような形態の多様性がカハール体の形成順序とどう関係するかは不明であった。

我々は低分子化合物であるハルミンが速やかに Coilin を核小体周囲の peri-nucleolar compartment (PNC) へと移動させることを見いだした。一方 SMN は核内で Coilin や snRNP が局在しない Gem 様の輝点として存在し続けた。またハルミンを除去すると短時間で Coilin と SMN を含む小さなカハール体を再構成することが明らかとなった。この特徴を利用してカハール体の再形成過程を観察した。すると新しく形成されるカハール体に含まれる SMN の輝点は、時間経過により肥大化して、Coilin と分離しリング状のものが増加した。つまりカハール体が拡大する過程で、SMN は Coilin から離れ規則性を持つ構造体へ変換されることが示唆された。

次に SMN の YG ボックスの変異体 Y272C の局在を観察した。通常の過剰発現条件では、野生型 SMN は核内のカハール体や Gem に加えて細胞質に大きな輝点を形成するが、Y272C 変異体では細胞質の輝点は減少していた。一方で核内のカハール体は Y272C では野生型よりも肥大し、超解像顕微鏡で観察すると、この肥大化したカハール体での SMN は Coilin と混じった状態のまま大きく歪なリング状となっていた。この結果は Y272C 変異体が Coilin から分離できないことを示している。YG ボックスは多量体化ドメインであることから、Coilin と SMN の分離には SMN の多量体化が不可欠で、カハール体形成が進むことで局所的な SMN 濃度が多量体化の閾値に達すると、自発的な多量体化により Coilin から分離した Gem を形成すると考えられた。

もう一つの化合物デヒドロコスツスラクトン(DCL)は、核内の Coilin、SMN のどちらの輝点も消失させる。どちらの輝点も消失させることから、DCL は Coilin、SMN 双方に作用する可能性が考えられた。

DCL の作用機構を調べるためウェスタンブロットを行ったところ、DCL 処理により SMN では移動度の高いバンドが現れ、このバンドシフトに着目して解析を行った。まず SMN のバンドシフトの原因となるアミノ酸を特定すべく、SMN 欠失変異体で DCL 処理の効果を観察した。Exon3 欠失でバンドシフトが見られなくなりバンドシフトの原因となるアミノ酸残基は Exon3 にあると予想された。また DCL と同一の作用を示すことが予想される化合物を、承認薬ライブラリーを用いたトランスクリプトーム解析から絞り込んだ。その結果、エタクリン酸が DCL と同様にカハール体消失や SMN のバンドシフトの変化を引き起こした。両化合物の特徴は細胞内グルタチオン濃度を低下させることである。グルタチオンは細胞内で発生した活性酸素を無毒化している。活性酸素は脂質過酸化を引き起こし、その産物の反応性アルデヒドはタンパク質のシステイン残基を修飾する。このことからグルタチオン濃度の低下により増加した反応性アルデヒドが SMN のシステイン残基を修飾し、バンドシフトを起こしたと予想した。そこで Exon3 領域の 2 つのシステイン残基の変異体を用いバンドを観察した結果、C146A 変異体で DCL によるバンドシフトが見られなくなり、バンドシフトの原因は C146 に修飾が生じたことであると示唆された。一方で C146A 変異体の細胞内局在は、DCL 処理によって分散したことから DCL で誘導される C146 修飾は SMN のバンドシフトの原因ではあるが、カハール体の分散には関与しないと考えられた。

さらに脂質過酸化の主な最終産物である 4-hydroxynonenal (4-HNE) を細胞に処理したところ、カハール体の分散が観察された。SMN を過剰発現させ、4-HNE 処理後に抗 4-HNE 抗体でウェスタンブロットを行ったところ、シフトバンドが抗 4-HNE 抗体で検出されたことから、C146 が 4-HNE で修飾されることが明らかとなった。また C146A 変異体を発現させると、4-HNE 修飾が SMN の元のバンドの位置で観察されたことから、4-HNE による SMN の修飾部位は C146 以外のシステイン残基にもあることが示された。この C146 以外のシステイン残基の修飾が局在変化に重要であると予想し、他のシステインの置換変異体の局在を観察した。その結果 YG ボックス周辺のシステイン置換変異体では DCL による SMN の分散が減弱したことから、YG ボックス周辺の修飾により、多量体形成が損なわれて SMN の輝点が分散したと考えられた。

本研究によりカハール体、Gem では SMN の多量体化による自発的な秩序形成により SMN のリサイクルが起こるメカニズムを提唱した。細胞内の非膜オルガネラ構成分子の脱離においてこのようなメカニズムが一般的であるかは今後の課題として興味深い。

また本研究により、SMN の YG ボックス周辺の修飾が SMN リサイクル機構の調節に影響することから、この修飾機構を標的として SMN のリサイクル過程の促進、維持により SMN 量を保証するような SMA 治療への展開も期待される。