



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15781">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15781</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/92026">https://hdl.handle.net/2115/92026</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Saki_0hazama.pdf



博士学位論文

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

大峽咲希

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻 生命医薬科学コース

RNA 生物学研究室

令和6年3月

## 目次

略語.....	4
序論.....	6
非膜オルガネラとその機能.....	6
カハール体は snRNP 生合成を効率よく進める.....	6
snRNP 生合成過程とカハール体.....	7
SMN 遺伝子の変異は脊髄性筋萎縮症 (SMA) を引き起こす.....	10
SMA を引き起こす SMN のミスセンス変異の種類.....	11
snRNP 量を検出する低分子化合物のライブラリースクリーニング.....	13
材料と方法.....	15
細胞培養.....	15
プラスミド.....	15
遺伝子導入.....	16
遺伝子ノックダウン.....	17
SDS-PAGE.....	17
ウェスタンブロット.....	17
免疫沈降.....	17
RNA プローブの設計と作製.....	18
<i>IN SITU</i> HYBRIDIZATION.....	18
免疫染色.....	19
超解像顕微鏡での観察サンプルの免疫染色.....	19
超解像顕微鏡での観察.....	20
培養細胞の LIVE IMAGING.....	20
共焦点顕微鏡を用いた観察.....	20
細胞ライセートの脱リン酸化処理.....	20
-SULFOBIOTICS-PEG-PCMAL を用いたチオール基ラベル.....	21
RNA-SEQUENCE 解析.....	21
CELL PROFILER3.1.9 による SMN Y272C 輝点サイズの解析.....	21
CELL PROFILER3.1.9 による SMN システイン置換変異体の核質分散の解析.....	21
大腸菌でのタンパク質発現、精製.....	22

## 第1章

SMN のリサイクル過程の可視化に基づいた分離機構の解明.....	27
結果.....	28
カハール体における SMN と COILIN の局在は多様である.....	28
核小体周囲コンパートメント (PNC) への COILIN 転位を誘導する化合物としてのハルミン の同定.....	30
ハルミンによって誘導された COILIN の PNC 転位は可逆的である.....	34
SMN は、新たに形成されたカハール体の拡大とともに、クラスター様分布へと進行する..	35
SMN または COILIN のいずれかを過剰発現させると、ハルミンに対する反応が変化する..	38
ハルミンを用いた共局在アッセイにより、SMN は TUDOR ドメインを介して COILIN と相互 作用することが明らかになった.....	40
SMN Y272C 変異体の過剰発現は、snRNA が保持されている COILIN と混在して分布する異 常なカハール体の形成を引き起こす.....	42
考察.....	45
SMN のカハール体からの脱離における多量体化の役割.....	45
ハルミンによる COILIN の PNC 転位機構の可能性.....	45
ハルミンをツール化合物として用いた SMN 変異体の分子挙動の解析.....	46

## 第二章

SMN 多量体化ドメインの修飾による構造体形成制御.....	49
結果.....	50
化合物 DEHYDROCOSTUS LACTONE (DCL) がカハール体を消失させる.....	50
DCL 類縁化合物においてカハール体、GEM が消失と SMN の SDS-PAGE の移動度の変化は 相関がある.....	52
DCL は複数の作用点を持つ.....	53
DCL 処理により SMN の SDS-PAGE の移動度の変化が起きる.....	55
SMN の SDS-PAGE での移動度の変化はシステイン C146 の修飾によって引き起される...	56
エタクリン酸は DCL と類似の効果を示す.....	59
脂質過酸化の産物は SMN のバンドシフトとカハール体消失を引き起こす.....	61
SMN C146A 変異体でも 4-HNE 修飾が起こる.....	64
C 末端システインの置換変異体はカハール体消失を抑制する.....	66
超解像顕微鏡による DCL 処理時のカハール体の観察.....	73
DCL 処理時におけるカハール体の微細構造の変化.....	73
DCL 処理からのカハール体回復過程での微細構造の回復.....	75

<b>考察</b> .....	77
DCL による SMN のシステイン修飾とカハール体形成能の低下 .....	77
DCL 除去によるカハール体再形成 .....	77
DCL による SMN のシステイン修飾 .....	78
SMN のシステインの修飾が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症に関与している可能性 .....	78
<b>第三章</b>	
<b>DCL の他の作用点の解析</b> .....	80
<b>結果</b> .....	81
DCL 処理により発現変動する遺伝子群の解析 .....	81
KDM ファミリーのノックダウンによりカハール体消失が抑制される .....	82
KDM ファミリーの阻害剤 JIB-04 でもカハール体消失を抑制される .....	84
COILIN の SDMA の変化は DCL によるカハール体消失に影響を及ぼさない.....	86
KDM と COILIN の結合は弱く相互作用する .....	86
<b>考察</b> .....	88
KDM ファミリーと通常時のカハール体形成調節 .....	88
KDM ファミリーと DCL 処理時のカハール体形成調節 .....	88
<b>総括</b> .....	90
SMA 発症の新たな機序の解明.....	90
局所翻訳と SMN の働き .....	90
<b>参考文献</b> .....	92
<b>謝辞</b> .....	101

## 略語

4-HNE	4-Hydroxynonenal
6MP	6-mercaptopurine
a.a.	amino acid
ADMA	asymmetric di-methyl arginine
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
APS	ammonium peroxodisulfate
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CPT	camptothecin
DCL	Dehydrocostus lactone
DMF	Dimethyl fumarate
DMSO	dimethylsulfoxide
DW	deionized water
EA	ethacrynic acid
FBS	fetal bovine serum
FBS	fetal bovine serum
HCMF	HEPES buffer, Ca <sup>2+</sup> -and Mg <sup>2+</sup> -free
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
MAO	Monoamine Oxidase
mRNA	messenger RNA
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PMA	phenylmercuric acetate
PML	promyelocytic leukaemia
Puro	Puromycin Dihydrochloride
PVA	poly-vinyl alcohol
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
SA	sanguinarium chloride
scaRNA	small Cajal body-associated RNA
SDMA	symmetric di-methyl arginine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	structured illumination microscopy

SMA	spinal muscular atrophy
SMN1	survival motor neuron 1
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SSC	saline sodium citrate
TDE	2,2'-thiodiethanol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 序論

### 非膜オルガネラとその機能

細胞内には様々な細胞小器官 (オルガネラ) が存在している。よく知られているオルガネラはミトコンドリア、ゴルジ体、葉緑体などがあるが、これらは二重の脂質膜に囲まれた特徴をもつ構造体である。しかし、脂質膜を持たないオルガネラである非膜オルガネラも多数存在し、これらの構造体はタンパク質や mRNA などの高分子が混み合っ存在する細胞内で、機能的に関係する分子を濃縮することで様々な生理機能を発揮する。非膜オルガネラには核小体、カハール体、核スペックル、PML ボディなどが挙げられる。核小体はリボソーム RNA の転写やプロセッシングの場、カハール体はスプライシングを触媒するスプライソソームのサブユニットである snRNP と呼ばれる核内低分子 RNA (snRNA) とタンパク質複合体の成熟化、核スペックルはスプライシング因子の集積、PML ボディは DNA の複製や転写、エピジェネティック制御に関わるなど、それぞれの構造体が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。

非膜オルガネラの構成因子には RNA やアミノ酸の組成が偏った天然変性領域を持つタンパク質が含まれていることが特徴である。非膜オルガネラの形成機構は、構成タンパク質や RNA の多価の相互作用による液-液相分離によると考えられているが<sup>1,2</sup>、このような形成原理が提唱されたのは最近であり、個別の構造体でその形成や消失が円滑に進む仕組みには不明な点が多い。

### カハール体は snRNP 生合成を効率よく進める

細胞がタンパク質を生成するためには、スプライシングによりゲノム DNA から転写された pre-mRNA からイントロンを除いてエキソンを接続し、mRNA が作られる必要がある。スプライシングはスプライソソームに触媒されることによって行われる<sup>3</sup>。スプライソソームのサブユニットは snRNP と呼ばれる、核内低分子 RNA (snRNA) とタンパク質複合体 snRNA と構成タンパク質からなる snRNP であり、U1、U2、U4、U5、U6 snRNP の 5 つのからなる<sup>3</sup>。スプライシングでこれらの snRNP は、まず U1 snRNP により標的の RNA の 5'スプライス部位と相補的な塩基対を形成して結合し、その後 U2 snRNP が RNA の分岐部位に結合する。そして U4/U6. U5 tri-snRNP が結合した後、U1、U4 snRNP が放出され、U6 と U2 snRNP が相互作用してスプライシング反応が進んでいく。

これらの snRNP の成熟は核内の非膜オルガネラの一つであるカハール体が多段階で関与することで、効率よく行われる。カハール体の主要構成因子は Coilin タンパク質であり、他に SMN タンパク質と Gemin2-8 タンパク質が含まれる SMN 複合体や、snRNA や核小体低分子 RNA (snoRNA)、そして snRNA のメチル化とシュードウリジン化修飾する際にガイドとして機能するカハール体局在低分子 RNA (scaRNA) など、多種の短

鎖 RNA が局在する構造体である<sup>4</sup>。カハール体に snRNP が蓄積することで効率よく成熟化の過程が進行することが知られており、カハール体により tri-snRNP 形成効率は核質の 10 倍以上に達すると報告され<sup>5</sup>、snRNP の高次複合体の形成効率を向上させている。またゼブラフィッシュ胚では coilin をノックダウンすると発生が停止し、snRNP の注入で回復することから<sup>6</sup>、カハール体は効率的な snRNP 形成を促進し、発生過程など多数の転写産物処理時に必要な大量のスプライソソームの安定供給に重要と考えられる。

カハール体は全ての細胞で存在するのではなく、平滑筋細胞や心筋細胞、皮膚細胞、脾臓実質細胞など、成体組織のある種の細胞では、カハール体は観察されないことが報告されている<sup>7</sup>。カハール体の形成は核内の snRNP のレベルと RNA プロセッシング速度により決定されることが示唆されており<sup>8,9</sup>、生体内においても、カハール体の数は転写速度の変化に素早く反応することができることが示されている<sup>10</sup>。

## snRNP 生合成過程とカハール体

snRNP の成熟過程を Figure 1 に示す。

まず snRNP の骨格となる snRNA は核内で RNA ポリメラーゼ II により転写され、カハール体に集積する<sup>11</sup>。この時の snRNA は前駆体の pre-snRNA であり 3'末端に短いオーバーハングと 5'末端は 7-メチルグアノシン (m7G) キャップを持つ。まず pre-snRNA の m7G キャップのキャップ結合複合体 (CBC) が結合し<sup>12,13</sup>、その後 snRNA と CBC に結合する snRNA 特異的輸出アダプターである Phosphorylated adapter RNA export protein (PHAX)、Arsenite-resistance protein 2 (ARS2) が結合し<sup>14</sup>、3'末端が一部切断される<sup>15</sup>。次に PHAX の核外輸送シグナルに export receptor chromosome region maintenance 1 (CRM1) が結合し核外輸送複合体を形成し、核膜孔を通り snRNA は核外へと輸送される<sup>16</sup>。PHAX はカハール体に局在しており PHAX の活性阻害は pre-snRNA のカハール体への蓄積を促進することから<sup>17</sup>、pre-snRNA はこれらのタンパク質の複合体の結合が起こることによりカハール体から離れると考えられている。

細胞質に移行すると snRNA は核外輸送複合体と解離する。その後、細胞質での snRNP の成熟として、SMN タンパク質と Gemin2-8 と unrip (unr interacting protein) からなる SMN 複合体により snRNA の Sm 結合配列への Sm コアの形成の促進と、それに続き 5' キャップのハイパーメチル化が起こる。

SMN は保存された領域として N 末端側に Gemin2 結合領域、中央に tudor ドメイン、C 末端側に YG ボックスという領域を持つ。SMN は SMN をコードする遺伝子 SMN1 遺伝子の exon2a に当たる領域で Gemin2 と結合し<sup>18</sup>、exon6 と 7 の一部に位置する YG ボックスに Gemin3 と Gemin8 が結合し、ほかの SMN 複合体の構成タンパク質はこれらに結合することで SMN 複合体を形成する<sup>19</sup>。カハール体の骨格となる主要な構成タンパク質は Coilin であるが、SMN は snRNA の輸送を介してカハール体形成を誘導すると

され、SMN のノックダウンによりカハール体が消失することが報告されており、カハール体形成と snRNP の集積には SMN による輸送が必要である<sup>20, 21</sup>。

Sm コアは7つの Sm タンパク質 SmD1、D2、F、E、G、D3、B からなる。個々の SMN 複合体成分の重要性を分析した研究から、SMN と Gemin2-4 が Sm コアの構築に必須であることが明らかになっている<sup>20</sup>。Sm タンパク質は pICln に結合しており、その状態では snRNA への結合は阻害されている。Sm タンパク質は SmB/B'-D3、D1-D2、E-F-G の3つのサブユニットを形成しており、SmD3、SmB、SmD1 の C 末端のアルギニン残基がタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼである PRMT5 によりメチル化されることによって、SMN 複合体との相互作用が高まる<sup>22, 23</sup>。そして SMN 複合体の SMN と Gemin2 が pICln に結合した Sm タンパク質と直接会合し、pICln からの遊離を誘導する<sup>24</sup>。また、Gemin5 は snRNA の特徴である 5'キャップと Sm 部位に直接結合し<sup>25</sup>、snRNA の認識に働くと考えられる。Gemin3 はヘリカーゼであり、snRNA の Sm 部位を露出させ Sm タンパク質との結合を可能にする snRNA の ATP 駆動型の構造変化を促進する<sup>26</sup>。このように SMN 複合体<sup>27</sup>によって、Sm タンパク質の snRNA の保存された Sm 結合部位への集合が促進され、リング状の Sm コア構造が形成される。

Sm コア形成後、トリメチルグアノシン合成酵素 TGS1 によって snRNA の 5'の 7-メチルグアノシンキャップは更にメチル化を受け、2,2,7-トリメチルグアノシン (m3G) に変換される。hTGS1 は snRNP の成熟過程で必須の遺伝子であり、この hTGS1 をノックダウンすると、カハール体が形成されなくなることが知られている<sup>9</sup>。

そして最後に 3'末端がプロセッシングされ、細胞質での成熟を終え、m3G キャップに snurportin1 (SPN1) というアダプタータンパク質が結合し、snRNP インポートの促進をする。SMN は SPN1 と importin $\beta$  の両方と相互作用し、Sm コアとインポート機構の橋渡しをし、核移行する。

核移行した snRNP と SMN 複合体はカハール体に局在することが知られている。カハール体に局在する Coilin は PRMT5 により C 末端に位置する RG 配列のアルギニンの対称的なジメチル化修飾 (SDMA) を受ける。この SDMA 修飾に依存して SMN はカハール体に局在することが知られている<sup>28</sup>。SMN は SDMA と相互作用する tudor ドメインがあり、Coilin の SDMA と相互作用する<sup>29</sup> ことでカハール体形成を誘導し、snRNP がカハール体に繫留される。

カハール体に蓄積した snRNP は snRNA の修飾と特異的タンパク質の付加を受ける。カハール体では snRNA の修飾を行う scaRNA が蓄積しており U1、U2、U4、U5 snRNA がカハール体に集積している scaRNA がガイドとして働くことで、部位特異的なシュードウリジン化 ( $\Psi$ ) および 2'-O-メチル化 (m) を受ける<sup>30</sup>。更に、カハール体で各 snRNP に特異的なタンパク質が結合する。

最終的な snRNP の成熟ステップである高次構造体の組み立てもカハール体で行われる。U4、U6 snRNA では U4/U6 di-snRNP を形成する。その後、カハール体にリクルー

トされた U5 snRNP が U4 / U6 di-snRNP に加わり U4 / U6. U5 tri-snRNP となる<sup>31</sup>。この tri-snRNP やこのほか U2 snRNP もカハール体で成熟の後、スプライシング反応を担っていく。

このようにして成熟していく snRNP であるが、snRNP は一細胞中に  $10^5$  個以上と大量に存在しており、snRNP 形成を維持するにはそのシャペロンである SMN の効率的なリサイクルも必須と予想される<sup>32</sup>。つまり、一度 Coilin との結合によりカハール体に集積した SMN が Coilin との結合を外し、カハール体から離れるメカニズムが必要である。しかし、その分離のメカニズムについては明らかにされていない。細胞によっては SMN は Coilin や snRNP を含まない Gem と呼ばれる核内構造体を形成すること知られており<sup>33</sup>、Gem がカハール体近傍に観察されることも多いことから、Gem はがカハール体から離れた SMN が一時的に集積する場所であると想定されている<sup>32</sup>。しかし、実際の Gem の機能や形成メカニズムについては明らかにされておらず、Gem に蓄積している SMN がカハール体から分離した SMN であるかは不明である。

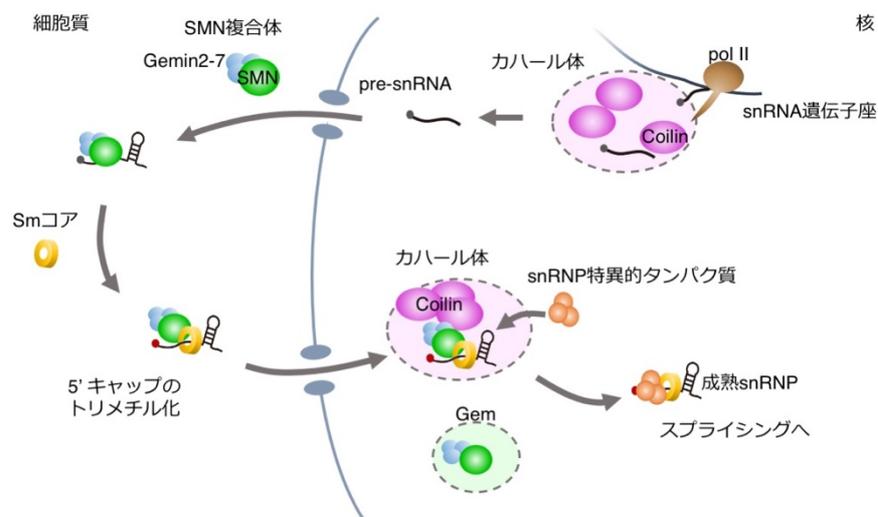


Figure 1

### snRNP は多段階で成熟する

核内で転写された pre-snRNA は一度カハール体に蓄積した後、細胞質に移行する。細胞質で SMN 複合体により Sm コアの形成、キャップの取りメチル化、3' のプロセッシングが起こり SMN 複合体と共に核内へ移行する。核内でカハール体に蓄積し、snRNA の修飾、snRNP 特異的タンパク質の付加を経て、最終的な成熟 snRNP となりスプライシングに使われる。

## SMN 遺伝子の変異は脊髄性筋萎縮症 (SMA) を引き起こす

ヒト以外のマウスなど他の霊長類や真核細胞では SMN タンパク質をコードする遺伝子は survival motor neuron のみであるが、ヒトでは染色体 5q13 上に survival motor neuron1 (SMN1) と SMN1 とは 5 塩基対異なる survival motor neuron2 (SMN2) 遺伝子が隣接して存在する<sup>34</sup>。しかし、SMN2 遺伝子からは全長の SMN タンパク質の産生量は少なく exon7 を欠失し機能喪失した SMN $\Delta$ 7 を主に産生する<sup>35,36</sup>。

SMN1 遺伝子の欠損や変異は常染色体劣性遺伝の疾患として、脊髄性筋萎縮症 (SMA) を引き起こすことが知られている<sup>34</sup>。SMA は脊髄の下位運動ニューロンの喪失を引き起こす神経原性の筋萎縮症である。乳児死亡の遺伝的原因であり<sup>37</sup>、有病率は 10 万人に 1 人と言われている。SMA 患者の 95% が SMN1 遺伝子欠失のホモ接合体であり、残りの 5% が SMN1 遺伝子の一部欠失、スプライス変異、ミスセンス変異であることが知られている。

SMN2 遺伝子から全長の SMN がほぼ産生されない理由は、SMN の exon7 内部にあるスプライシングの促進をするシスエレメントである exonic splicing enhancer (ESE) が SMN2 の C→T の 1 塩基の置換により破壊されるためであり、exon7 がスキッピングし exon6 と exon8 を繋ぐスプライシングが起こりやすくなる<sup>35</sup>。その結果、SMN2 から産生される mRNA のうち 90% が exon7 を欠いた SMN $\Delta$ 7、全長の SMN は 10% となる。全長の SMN タンパク質は exon1 の開始コドンから exon7 の終止コドンまでの 294 アミノ酸からなるタンパク質であるが、SMN $\Delta$ 7 は exon1-6 に加え、通常は非コードの exon8 由来の EMLA の 4 残基の配列を含んだ 282 アミノ酸からなるタンパク質となる。

しかし、SMN1 の欠失した SMA 患者ではこの SMN2 から少量でも SMN タンパク質が産出され機能することが重要となる。SMA は発症時期や症状によって重症なものから Table1 のように Type0~4 に分類されている。SMN2 のコピー数は人によって異なっており<sup>34,38</sup>、SMN2 のコピー数が少ないほど重症となることが知られている<sup>38,39</sup>。

SMN2 遺伝子を持たないヒト以外の動物種であるマウスの smn 欠失変異体では胎生致死となる<sup>40</sup>、ゼブラフィッシュの SMN のノックダウンにより軸索パターンの異常と致死<sup>41</sup>を示すなど、ヒト以外では Smn 遺伝子が欠損すると致死となることが知られている。SMA モデルマウスとしては Smn の欠失と Human の SMN2 を 2 コピー発現させることで胎生致死とならず SMA の type1 に類似した表現型を示すトランスジェニックマウス<sup>42,43</sup>が用いられており、SMN2 のコピー数を 8 にすると表現型が改善されることが報告されている<sup>43</sup>ことから SMN 量が疾患に重要であるといえる。

現在では、SMA の治療方法として SMN 量を補充する手法が用いられ、3 種類の治療薬が承認されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、SMN2 遺伝子の pre-mRNA の intron7 に結合し、exon7 のスキッピングを抑制するヌシネルセン (スピクラザ) や SMN2 遺伝子の pre-mRNA のスプライシングを修飾し、SMN タンパク質の産生を増加させる低分子化合物低分子薬であるリスジプラム (エブリスデイ)、AAV9 ベクターにより遺伝子治療を行うオナセムノゲンアベパルボベク (ゾルゲンスマ) が使用されている<sup>44</sup>。

Table1 SMA 患者の分類

SMA Type	発症時期	運動発達レベル	SMN2コピー数	割合
0	出生前~	首が座らない	1	不明
1	0~6ヶ月	首が座る、座位不能	1~2	~60%
2	7~18ヶ月	座位可能、立位不能	3	~27%
3	18ヶ月~	立位可能、歩行可能	3~4	~12%
4	成人	立位可能、歩行可能	4~	~1%

### SMA を引き起こす SMN のミスセンス変異の種類

SMA で見られる SMN1 のミスセンス変異は Table2 の位置で確認されている<sup>45</sup>。変異位置により SMN2 コピー数から想定される重症度と同等であり SMN1 の欠失と同様の機能喪失をする変異 (Severe) と、想定されるよりも軽度な変異 (Mild) を引き起こす変異が存在する<sup>46</sup>。これらのミスセンス変異に注目すると SMA 発症に繋がる SMN の機能を明らかにすることができる。

Table2 より SMA 患者で見られる SMN のミスセンス変異は tudor ドメインと YG ボックスに集中して見られる<sup>47</sup>。

Tudor ドメインは、Coilin や Sm タンパク質の対照的にジメチル化されたアルギニン (SDMA) と相互作用をする。また、tudor ドメインの変異体である E134K では SMN は核内へのタンパク質の輸送を行なう importin $\beta$  に結合出来なくなり核内に移行しにくくなることも報告されている<sup>48</sup>。Tudor ドメインの変異では SMN 同士の結合に変化は見られないが Sm タンパク質との結合の低下が報告されている変異で重度な症状であり、tudor ドメインの機能喪失により snRNP アセンブリが低下するため疾患が引き起こされると考えられている。

YG ボックスは SMN 同士の多量体形成に働く。多量体化ドメインの変異では SMN との結合が減弱する変異により重度な症状が引き起こされている<sup>45, 49</sup>。SMN の多量体化ドメインである YG ボックスは exon6 から exon7 に位置し、(YxxG)<sub>3</sub> を含む高度に保存された配列である。分子遺伝学的、系統発生的、生物物理学的、生化学的、計算的アプローチによって、この配列によりグリシンジッパーによる二量体が形成され、この二量体同士が二量体化には関与しない特定の YG ボックス残基に依存し 4 量体を形成し、8 量体までの多量体化することが明らかになった<sup>49, 50, 51</sup>。SMN の exon6 の SMA で見ら

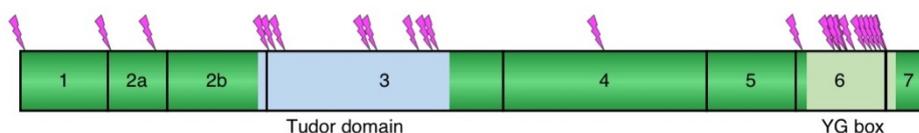
れるミスセンス変異体 (Y272C) と exon7 欠失変異体では、*in vitro* での自己相互作用アッセイで相互作用の減少を示し<sup>52,53</sup>、ゲルろ過クロマトグラフィーによる複合体の分子量のアッセイで分子量の低下を示す<sup>53</sup>ことが報告されており、YG ボックスの機能喪失により多量体形成が低下していることが示されている。

また、SMN の多量体化による機能としては、*in vitro* で GST-SMN を過剰な SMN と共にインキュベートを行ない SMN の多量体を形成させた後に Sm タンパク質との結合の検出を行うと、SMN の多量体化をしたサンプルでは Sm タンパク質の SmB、D1、D3 と SMN の結合が増強されることが明らかになっている<sup>53</sup>。そして、SMN の YG ボックスの機能喪失をする exon6 のアミノ酸置換変異体 (Y272C) と exon7 欠失変異体では Sm タンパク質の結合量が低下することが報告されている<sup>52,53</sup>。

SMN はユビキチン化されプロテアソームにより分解することが知られている。多量体形成が阻害される SMN $\Delta$ 7 や exon6 の欠失やミスセンス変異体では培養細胞内でタンパク質の分解が野生型と比べ早い<sup>54</sup>ことが知られ、多量体化によりタンパク質が安定化している可能性がある。

よって、SMN の YG ボックスを介した多量体形成は Sm タンパク質の集合や snRNP アセンブリを促進しており、多量体形成能が低下した変異体での snRNP アセンブリに繋がっていると考えられている。しかし、どのようにこれらの機能を発揮しているかという点については不明であり、多量体形成の不全が疾患を引き起こす仕組みも明らかになっていない。

Table2 SMA 患者で見られる SMN1 の変異位置と特徴



変異位置	Exon	変異の影響	SMA Type	SMN2コピー	SMNとの結合	Smタンパク質との結合	snRNPアセンブル*1
A2G	1	Mild	3	1	++	++	++
D30N	2A	Mild	2	2	+++	+++	+++
D44V	2A	Mild	3	1	+++	+++	++
W92S	3	Severe	1	3	不明	+	不明
V94G	3	Severe	2	3	不明	不明	不明
G95R	3	Mild	3	1	+++	+++	不明
A111G	3	Mild	1~2	2	+++	+++	+++
I116F	3	Severe	1	2	不明	不明	+
Y130C	3	Mild	3	2	不明	不明	不明
E134K	3	Severe	1	2	+++	+*2	+
Q136E	3	Severe	1	1	不明	不明	+
A188S	4	Severe	1	不明	不明	不明	不明
P245L	6	Mild	3	不明	不明	不明	不明
L260S	6	Severe	2	2	不明	不明	不明
S262G	6	Mild	3	1	不明	不明	不明
S262I	6	Mild	3	1	++	++	不明
M263R	6	Severe	1	2	不明	不明	不明
M263T	6	Mild	2	1	不明	不明	不明
S266P	6	Mild	2	2	不明	不明	不明
Y272C	6	Severe	1	2	+	+	+
H273R	6	Mild	2	不明	不明	不明	不明
T274I	6	Mild	3	1	++	++	+++
G275S	6	Mild	3	不明	不明	不明	不明
G279C	7	Severe	1	不明	不明	不明	不明
G279V	7	Severe	1	不明	+	+	+

Gemin2結合ドメイン	*1 SMN野生型の少量存在下でのsnRNPアセンブル能力 *2 全長SMNではなくtudorドメインのみで行ったSmタンパク質結合アッセイ
Tudorドメイン	
YGボックス	

## snRNP 量を検出する低分子化合物のライブラリースクリーニング

我々は、スプリットルシフェラーゼのレポーター<sup>55</sup> (Figure 2) を使用して、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングによって細胞の U5 snRNP または tri-snRNP レベルを変化させる低分子化合物を取得した。

カハール体は snRNP 成熟の場であり、カハール体形成は snRNP 生合成に依存している。例えば細胞質での snRNA の成熟において 5'キャップのメチル化を行う hTGS1 は snRNP の成熟過程で必須の遺伝子であるが、hTGS1 のノックダウンによりカハール体は形成されなくなる<sup>9</sup>。よって snRNP 生合成に影響を及ぼす化合物はカハール体の形成状況を変化させると考え、snRNP 検出系でスプリットルシフェラーゼ活性を低下させる

ヒット化合物のカハール体への影響を観察した。その結果、カハール体形成を変化させる化合物として、Coilin を核小体周辺の peri nucleolar compartment (PNC) に移行させるハルミンとカハール体を消失させる化合物 Dehydrocostus lactone (DCL) の 2 種類を見出した。

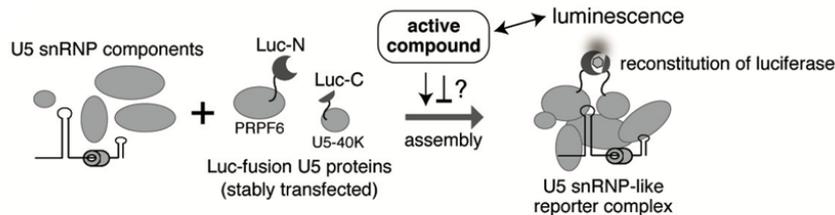


Figure 2

snRNP 量を検出するスプリットルシフェラーゼによる化合物スクリーニング  
 snRNP 検出レポーターはスプリットルシフェラーゼを応用し、snRNP 形成依存的に  
 ルシフェラーゼ活性を再構成する

本研究ではこれらの 2 種類の化合物を用いて、カハール体から SMN が分離していくメカニズムに着目して研究を行った。その結果、SMN のカハール体の形成、消失サイクルにおける多量体化ドメインの役割についていくつかの重要な知見を得たので報告したい。

ハルミンを用いた研究では、ハルミンを除去後の Coilin のカハール体への再形成が早期に起こることから、再形成過程での SMN と Coilin の局在パターン変化を観察した。その結果より SMN はカハール体形成から時間の経過により SMN や Coilin の分子数が増加することでカハール体から SMN が秩序を持った構造になり分離することが示された。また、SMA を引き起こす SMN の変異であり多量体形成を低下させる変異である Y272C の局在観察により、多量体化ドメインがカハール体から SMN の分離、Gem 形成に役割を担っていることが明らかになった。

更に、DCL を用いた研究より、SMN の多量体化ドメイン周辺の親電子性物質による修飾が SMN の機能不全を引き起こすことが示唆された。多量体化がリサイクルに果たす役割を踏まえると、細胞内環境の調節により SMN のリサイクルを維持できる可能性がある。

## 材料と方法

### 細胞培養

HeLa 細胞、293T 細胞は、DMEM/Ham's F-12 (富士フイルム和光純薬工業 048-29785) に 10% fetal bovine serum (FBS)、0.1 mg / mL penicillin および 0.1 mg / mL streptomycin を添加して 37 度、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行なった。

### プラスミド

#### FLAG-SMN、SMN 欠失変異体、SMN アミノ酸置換変異体発現プラスミド

FLAG-SMN-WT 発現プラスミドは Human の培養細胞由来の RNA より cDNA を作成し SMN を発現する遺伝子である SMN1 をクローニングし、FLAG tag を Tol2 ベクターである pT2KXIGΔin プラスミド<sup>56</sup>へ Gibson Assembly (NEW ENGLAND Biolabs) のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

SMN 欠失変異体、SMN アミノ酸置換変異体プラスミドは FLAG-SMN-WT 発現プラスミドを鋳型として、PCR で増幅し、Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ、各ベクターを作製した。

siRNA 耐性 SMN は siRNA 配列に耐性を持つようにナンセンス変異を導入した SMN を PCR により増幅し、Tol2 ベクターである pT2KXIGΔin プラスミド<sup>56</sup>へと Gibson Assembly のキットによりクローニングした。

また FLAG-SMN-ΔN、FLAG-SMN-Δ1、FLAG-SMN-Δ1-2a、FLAG-SMN-Δ1-2b、FLAG-SMN-ΔC、FLAG-SMN-ΔE3、FLAG-SMN-ΔE4、FLAG-SMN-ΔE7 の比較を行ったウェスタンブロット (Figure 2 C、2D、20A) で用いた発現プラスミドについては、SMN の最初のメチオニン、アラニンが欠失しており、これらを用いた変異体との比較においては全て SMN の最初のメチオニン、アラニンが欠失したプラスミドを使用した。

#### FLAG-Coilin、欠失変異体発現プラスミド

HeLa 細胞由来の RNA より cDNA を作成し Coilin を発現する遺伝子 COIL をクローニングした。FLAG tag と coilin と pT2KXIGΔin プラスミド<sup>56</sup>のバックボーンを Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

Coilin 欠失変異体プラスミドは FLAG-Coilin-WT 発現プラスミドを鋳型として、PCR で増幅し、Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ、各ベクターを作製した。

#### FLAG-Coilin-mRuby2 発現プラスミド

FLAG-Coilin 発現プラスミド、mRuby2 を PCR で増幅し Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

#### V5-Coilin 発現プラスミド

V5 tag と coilin と pT2KXIGΔin プラスミド<sup>56</sup> ベクターのバックボーンを PCR で増幅し Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

#### Coilin GGGGS\*5 mRuby2 発現プラスミド

人工遺伝子合成の gBlocks Gene Fragments (Integrated DNA Technologies、 IDT)により COIL とリンカー配列である GGGGS 5 回の連続配列を合成し、これと PCR で増幅した mRuby2 と pT2KXIGΔin<sup>56</sup> プラスミドのバックボーンを Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

#### EGFP-FLAG-SMN 発現プラスミド

Human の培養細胞由来の RNA より cDNA を作成し SMN を発現する遺伝子である SMN1 をクローニングし、FLAG tag と EGFP を Tol2 ベクターである pT2KXIGΔin プラスミド<sup>56</sup>へ Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

#### 大腸菌発現用 SMN-exon3 プラスミド

クローニングした Human SMN1 から exon3 である 91 番目から 158 番目のアミノ酸に当たる領域を PCR により増幅した。大腸菌発現用プラスミドである pGEX-6P-1 を BamHI と XhoI で切断し、PCR 産物と Gibson Assembly のキットを用いてつなぎ合わせ作製した。

上記全てのプラスミドの目的タンパク質をコードする領域はシーケンス解析を fasmac (<http://fasmac.co.jp>) に外注して正しい配列であることを確かめた。使用したプライマー配列を table4, 5 に記載した。

#### KDM4A 発現プラスミド

KDM4A である JMJD2A がクローニングされた Kristian Helin により作製された pCMV-HA-JMJD2A<sup>57</sup> (Addgene plasmid #24180 ; <http://n2t.net/addgene:24180> ; RRID : Addgene\_24180) を使用した。

### 遺伝子導入

培養細胞の遺伝子導入に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。実験では遺伝子導入してから 1~2 日後の細胞を使用した。遺伝子導入は製造元の指示の半量の Lipofectamine 2000、プラスミド量で行い、手順は製造元の指示に従い、フォワードトランスフェクションを行った。

## 遺伝子ノックダウン

siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。手順は製造元の指示に従い、フォワードトランスフェクションを行った。

使用した siRNA は以下の通りである。

SMN : Hs\_SMN1\_12 GeneGlobe ID - SI04950939 (QIAGEN FlexiTube siRNA)

KDM3A : \_1 s224393 (Thermo Silencer Select)

KDM3A\_2 : s31586 (Thermo Silencer Select)

KDM4A\_1 : s18635 (Thermo Silencer Select)

KDM4A\_2 : s18637 (Thermo Silencer Select)

KDM4A\_3 : s18636 (Thermo Silencer Select)

## SDS-PAGE

Laemmli 法に基づきポリアクリルアミドゲルを作製した。ポリアクリルアミドゲルの調製には 30%アクリルアミド (アクリルアミド : N,N'-メチレンビス = 29.2 : 0.8) を調製して用いた。分離ゲル溶液 (15%または 12.5%アクリルアミド、375 mM Tris-HCl (pH8.8)、0.1% SDS)と濃縮ゲル (5% アクリルアミド、125 mM Tris-HCl (pH6.8)、0.1% SDS)に、APS (分離ゲル : 0.1%、濃縮ゲル : 0.06%) と TEMED (分離ゲル : 0.05%、濃縮ゲル : 0.3%) を加えてゲル化させた。電気泳動は SDS running buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を用いて等電圧で行なった。

## ウェスタンブロット

PBS で洗浄した細胞に 2×SDS-PAGE サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% グリセロール、0.01% ブロモフェノールブルー、10% 2-メルカプトエタノール) を加えて回収した。回収した細胞抽出液を 95 度で 5 分間加熱し、超音波処理を行なった。15%ポリアクリルアミドゲルを用いて細胞抽出液を SDS-PAGE で分離後、セミドライ方式で PVDF 膜に転写した。2.5% スキムミルク / PBST (PBS、0.01% Tween-20) で 20 分ブロッキングを行ない、その後室温で 1 時間一次抗体反応を行なった。PBST で 3 回洗浄後、二次抗体反応を室温で 1 時間行なった。二次抗体は PBST で 6000 倍希釈した Alexa Fluor 680-conjugated (Molecular Probes、Eugene、OR、USA) または IRDye800 (Rockland、Philadelphia、PA、USA) を用いた。PBST で 3 回洗浄後、Odyssey (Infrared Imaging System、LI-COR Biosciences) を用いてシグナルを検出した。

## 免疫沈降

PBS で洗浄した細胞を RIPA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1% NP40、0.1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、0.15 M NaCl、1 mM EDTA) で懸濁し、氷上に 20 分静置し、遠心を行ない細胞抽出液を得た。各サンプルに対し RIPA buffer により 3 回洗浄した抗

FLAG M2 アフィニティーゲル (Sigma, A2220) 10  $\mu$ L を用意した。細胞抽出液を、洗浄後の抗 FLAG M2 アフィニティーゲルに加え、4 度で 1 時間、ローテーターで回転させた。遠心後に上清を取り除き、RIPA buffer を加えて 3 回洗浄を行なった。2 $\times$ SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、95 度で 5 分加熱し、遠心して回収した上清を実験に用いた。

## RNA プローブの設計と作製

Human U2 snRNA 全長を、ゲノム DNA を鋳型として PCR で伸長後、pGEM T Easy ベクターに挿入し、シーケンス解析を行なって目的の配列の挿入および挿入された方向を確認したベクターをプローブ作製に使用した。このプラスミドを M13 プライマーを用いた PCR で U2 snRNA と T7 プロモーターを含む領域を増幅し、Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega) を用いて精製した。その後、DIG / FITC RNA labeling kit (Roche) を用いて *in vitro* 転写を行ない、RNA プローブを合成した。合成した RNA プローブは Centri Pure Mini (emp BIOTECH) を用いて精製し、当量のホルムアミドを加えて保存・使用した。

## *in situ* hybridization

前処理 (Proteinase K(-))

0.1mg/ml の Poly-L-lysine (Sigma) でコーティングしたカバーガラス (Assistent 18 mm Deckglas-Diche 0.17  $\pm$  0.01 mm または MATSUNAMI MICRO COVER GLASS 18 丸 No.1) を入れた 12well プレートで培養した細胞に 4% PFA/HCMF を用いて 4 度で室温 10 分固定した。その後、PBS と DW で洗浄し、0.5% TritonX-100 / PBS を加え 10 分間透過処理を行った。

Prehybridization、Hybridization

prehybridization 溶液 (50% ホルムアミド、Denhardt's solution、2 $\times$ SSC (1.5 mM Trisodium Citrate、15 mM NaCl)、10 mM EDTA、100  $\mu$ g / mL yeast tRNA、0.01% Tween-20) をサンプル全体に行き渡らせ、湿潤容器に入れて 55 度で 2 時間の処理を行なった。prehybridization 溶液を除いた後、hybridization 溶液 (prehybridization 溶液に 5% Dextran Sulphate を加えたもの) で 100 倍に希釈した U2 snRNA プローブをサンプル全体にかけ、湿潤容器に入れて 50 度で一晩処理した。

洗浄

hybridization 後のサンプルを 50% ホルムアミド / 2 $\times$ SSC 溶液 (2 $\times$ SSC、0.01% Tween-20) で 50 度で 30 分間の洗浄を 2 回行なった。その後、RNase buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM NaCl、1 mM EDTA、0.01% Tween-20) でリンスし、RNase A 処理 (10  $\mu$ g

/mL RNaseA、RNaseA buffer) を 37 度、1 時間行なった。再び RNase buffer でリンスした後、2×SSC 溶液と 0.2×SSC 溶液 (0.2 × SSC、0.01% Tween-20) でそれぞれ 50 度、30 分間洗浄し、TBST (TBS、0.01% Tween-20) に移した。

#### 検出

TBST に溶かした Blocking Reagent (Roche) を用いて室温で 10 分間ブロッキングを行なった。その後、一次抗体で室温、1 時間の反応を行なった TBST で 3 回洗浄した後、蛍光ラベル二次抗体(TDE マウントするサンプルは Cy2-mouse / Cy3-rabbit、PVA マウントするサンプルは Alexa488-mouse / Cy3-rabbit / DAPI) を加えて室温、1 時間反応させた TBST で 2 回、PBS で 1 回洗浄後に 4% PFA / HCMF で室温、10 分間固定した。固定後 PBS で 1 回、TBST で 2 回、DW で 1 回洗浄した。

#### マウント

超解像顕微鏡で観察を行うサンプルは 10%、25%、50%、97% 2,2'-チオジエタノール (TDE) (全て 0.01×PBS) で室温で 5 分間ずつ順に置き換えを行なった後に TDE マウント剤 (97%TDE、2% Dabco、0.1 µg/ml DAPI、0.01×PBS) でマウントし、周囲をトップコートで密封した。蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡で観察したサンプルは PVA マウント剤 (16% PVA、8% sucrose、4.8%グリセロール、2% Dabco / 0.8×PBS) でマウントした。

#### 免疫染色

カバーガラス (MATSUNAMI MICRO COVER GLASS 10×20 mm THICKNESS No.1 0.12~0.17 mm) で培養した細胞に 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / HCMF (10 mM HEPES (pH7.4)、137 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、5.6 mM glucose、1 mg Phenol red)の固定液を入れて 5 分間室温で固定した。HCMF で 3 回洗浄した後に 0.5% TritonX-100 / PBS (137 mM NaCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.68 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を加え 5 分間透過処理を行なった。ブロッキング溶液 (0.1% FBS / PBS) で希釈した一次抗体で 37 度で 1 時間反応を行なった。TBS (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5)) で 3 回洗浄後に蛍光ラベル抗体で二次抗体反応を 37 度で 1 時間行なった。TBS で 3 回洗浄後 PVA マウント剤 (16% PVA、8% sucrose、4.8% グリセロール、2% Dabco / 0.8×PBS) でカバーガラスを被せてマウントした。周りをトップコートでシールして観察サンプルとした。正立顕微鏡 (Olympus BX51) を用いて観察し、顕微鏡用カラーカメラ (Olympus DP47) で撮影した。

#### 超解像顕微鏡での観察サンプルの免疫染色

0.1 mg / ml の Poly-L-lysine (Sigma) でコーティングしたカバーガラス (Assistent 18 mm Deckglas-Diche 0.17 ± 0.01 mm) を入れた 12well プレートで培養した細胞に 4%パラホル

ムアルデヒド (PFA)/HCMF の固定液を入れて 5 分間室温で固定した。HCMF で 3 回洗浄した後に 0.5% TritonX-100 / PBS を加え 5 分間透過処理を行った。ブロッキング溶液 (0.1% FBS / PBS) で希釈した一次抗体で 37 度で 1 時間反応を行なった。TBS で 3 回洗浄後に蛍光ラベル抗体 (Cy2-mouse / Cy3-rabbit) で二次抗体反応を 37 度で 1 時間行なった。TBS で 3 回洗浄後 10%、25%、50%、97% TDE (全て 0.01×PBS) で室温、5 分間ずつ置き換えを行った後に TDE マウント剤 (97% TDE、2% Dabco、0.1 µg/ml DAPI、0.01×PBS) でマウントし、周囲をトップコートで密封した。

### 超解像顕微鏡での観察

ELYRA PS1 (ZEISS) で、100×対物レンズ (NA 1.46; ZEISS) を使用して 100nm 間隔で Z stack を 50 枚 (計 5 µm) 撮影した。SIM 画像を、ZEN 2011 [black edition] のデフォルトのパラメーター設定で作製した。アライメントファイルを用いてチャンネルアライメントを行った。Z 軸の切片の画像のうち最も構造体が大きく見える切片をデータとして示した。

### 培養細胞の Live imaging

3.5cm ガラスベースディッシュ (IWAKI 3970-035) に培養した細胞を培地をフェノールレッド不含の DMEM/Ham's F-12 (富士フイルム和光純薬工業 045-30665) に 10% FBS を添加した培地に交換した後、37 度、5% CO<sub>2</sub> に設定した LSM900 (ZEISS) で、60× 対物レンズ (NA 1.20) を用いて 400nm 間隔で Z stack を 11 枚 (4 µm)、2 分間隔で撮影した。

撮影後、ZEN 3.4 blue edition を使用して Airyscan Processing で画像を作製した後、最大強度を XY 平面に直交投影した画像を作製した。

### 共焦点顕微鏡を用いた観察

LSM900 (ZEISS) で、60× 対物レンズ (NA 1.20) を用いて 400nm 間隔で Z stack を 11 枚撮影 (4 µm) した。撮影後、ZEN 3.4 blue edition を使用して Airyscan Processing で画像を作製した後、最大強度を XY 平面に直交投影した画像を作製した。

### 細胞ライセートの脱リン酸化処理

HeLa 細胞に FLAG-SMN を過剰発現させ、FLAG tag で免疫沈降を行ったライセートを Tris HCl (pH9.6) で希釈し、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (TOYOBO CAP-101) を添加し 37 度で 1 時間インキュベートした。

### **-sulfoBiotics- PEG-PCMal を用いたチオール基ラベル**

細胞培養の条件下で HeLa 細胞に DCL 処理 (20  $\mu$  M、4 時間)を行った後に、DTT (2 mM)を添加し 10 分処理した。培地を除去し PBS で wash 後 Lysis バッファー (0.5% Triton-X-100、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA) で細胞抽出液とした。抽出液に PEG-PCMal (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) を終濃度 0.5 mM で添加し 37 度で 30 分インキュベートすることでチオール基にラベルを行った。これに 2× SDS-PAGE サンプルバッファーを加え 95 度で加熱したサンプルを、SDS-PAGE で泳動を行った。泳動後のゲルをトランスイルミネーター (Spectroline TC-312A transilluminator) で 10 分間 UV を照射することで、PEG-PCMal の PEG 鎖を切断した。その後のゲルを上記のウェスタンブロットの方法に従い、メンブレンへの転写、抗体反応を行った。

### **RNA-sequence 解析**

DMSO または DCL (20  $\mu$  M) で 4 時間処理した 293T 細胞から抽出した全 RNA を用い RNA-seq ライブラリー調製に使用した。このプロセスでは Ribo-zero Gold rRNA Removal Kit (Illumina) と TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina) を製造元の指示に従い使用した。HiSeq2500 (Illumina) で取得した Single-end sequencing read を STAR (version 2.5.3a)で hg38 reference genome にアライメントした。発現変動遺伝子の検出に edgeR<sup>58</sup>、Gene Ontology (GO) 解析には Panther (<https://www.pantherdb.org/>)<sup>59</sup>を用いた。

### **Cell profiler3.1.9 による SMN Y272C 輝点サイズの解析**

Cell profiler 3.1.9 を使用し以下の手順でデータを得た。() 内には、使用した Cell profiler 3.1.9 のモジュールを示した。

DAPI による細胞核の染色画像から、核の領域を認識した (IdentifyPrimaryObjects)。FLAG tag の染色画像の輝点を強調した画像を作製した (EnhanceOrSuppressFeatures)。作成した画像のうち核以外の領域をマスクし (MaskImage)、マスク後の画像から輝点を認識した (IdentifyPrimaryObjects)。これにより、核内の FLAG の輝点が認識された。この輝点のそれぞれのサイズをピクセル数で算出した (MeasureObjectSizeShape)。ピクセル数のデータを出力し (ExportToSpreadsheet)、撮影した画像の面積より輝点サイズの単位を  $\mu\text{m}^2$  に換算した。その後 R を使用してそれぞれの輝点サイズをプロットしたグラフを作成した<sup>60</sup>。データはそれぞれ 10 セットずつの画像から得た。

### **Cell profiler3.1.9 による SMN システイン置換変異体の核質分散の解析**

Cell profiler 3.1.9 を使用し以下の手順でデータを得た。() 内には、使用した Cell profiler 3.1.9 のモジュールを示した。

DAPI による細胞核の染色画像から、核の領域を認識した (IdentifyPrimaryObjects)。FLAG tag の染色画像の輝点を強調した画像を作製した (EnhanceOrSuppressFeatures)。作成した画像のうち核以外の領域をマスクし (MaskImage)、マスク後の画像から輝点を認識した (IdentifyPrimaryObjects)。これにより、核内の FLAG の輝点が認識された。次に、核の領域から核内の FLAG の輝点の領域を除く領域を求めることで、輝点が存在しない核質の領域を設定した (IdentifyTertiaryObjects)。FLAG の染色画像における核の領域と核質の領域の輝度を測定し (MeasureObjectIntensity)、出力した (ExportToSpreadsheet)。その後 R を使用してデータとして使用する FLAG の輝度の範囲を設定し、核質分散として核質の輝度 / 核内の輝度を算出し、グラフを作成した<sup>60</sup>。データはそれぞれ 10 セットずつの画像から得た。

## 大腸菌でのタンパク質発現、精製

BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL に pGEX-6P-1 に SMN の exon3 をクローニングしたベクターをエレクトロポレーション法により導入し、アンピシリンプレートに撒き 37 度で一晩培養し、ベクターが導入された大腸菌のコロニーを得た。

ZB 培地 (NZ アミン 10 g、NaCl 5g / 1 L) + 100  $\mu$ g / mL アンピシリン培地 30 mL にコロニーを 15 個程度加えて前培養を 30 度で一晩行った。前培養した培養液を ZB+アンピシリン培地 500 mL に移して 30 度で 3.5~4.5 時間、OD 0.4~0.5 になるまで培養した。IPTG を終濃度 1 mM となるように加え、30 度で 3.5~4 時間培養を続けた。培養液を遠心して集菌し、PBS で懸濁し、終濃度 0.5% となるように NP-40 を加え混合した。リゾチームを終濃度 1 mg / mL となるように加え混合し、氷上に 10 分静置した後、液体窒素で凍結した。

凍結した大腸菌を解凍し、フレンチプレスを 2 回行い破碎した。破碎したサンプルを PBS で平衡化したグルタチオンセファロース 4B (GE Healthcare、17-0756-05) に加え、4 度で 2 時間 rotate しタンパク質を結合させた。遠心した後、グルタチオンセファロース 4B を PBS-0.5% NP40-0.5M NaCl で wash を 4 回行った。G バッファー (50 mM Tris-HCl pH 9.6、1mM DTT) に置換し、遠心し上清を除去した後、G バッファー 500  $\mu$ L + 還元型グルタチオン 30 mg を加え 4 度で一晩 rotate した。遠心し、上清をサンプルとした。

Table 3 使用した抗体

Target name	Catalog code	Supplier	Species
anti-Coilin	0967-1-AP	Proteintech	rabbit polyclonal
anti-Coilin	c-300	SantaCruz	rabbit polyclonal
anti-SMN (clone 8/SMN)	610646	BD Biosciences	mouse monoclonal
anti-SMN (2B1)	NB100-1936SS	Novus	mouse monoclonal
anti-SMN2	22329-1-AP	Proteintech	rabbit polyclonal
anti-Fibrillarlin	38F3	Abcam	mouse monoclonal
anti-Nopp140 (E-7)	sc-374033	SantaCruz	mouse monoclonal
anti-Gemin2 (2E17)	ab6084	Abcam	mouse monoclonal
anti-4 Hydroxynonenal	ab46545	Abcam	rabbit polyclonal
anti-alpha Tubulin	ab7291	Abcam	mouse monoclonal
anti-GAPDH	10494-1-AP	Proteintech	rabbit polyclonal
anti-DYKDDDK (FLAG tag)	012-22384	Wako	mouse monoclonal
anti-V5	13202	cell signaling	rabbit monoclonal
anti-HA	1867423	Roche	rat monoclonal
anti-GFP	598	MBL	rabbit polyclonal
anti-DIG	11333062910	Roche	mouse monoclonal
anti-FITC	A889	Invitrogen	rabbit polyclonal
Anti-dimethyl-Arginine Antibody, symmetric (SYM10) (SDMA)	07-412	Sigma	rabbit polyclonal
anti-Asymmetric Di-Methyl Arginine Motif [adme-R] (ADMA)	13522	cell signaling	rabbit polyclonal
anti-Ms IgG-Alexa488	A11001	Invitrogen	secondary antibody
anti-Ms IgG-Alexa680	A21057	Invitrogen	secondary antibody
anti-Ms IgG-Cy2	715-225-150	Jackson	secondary antibody
anti-Ms IgG-Cy3	AP124C	Sigma	secondary antibody
anti-Ms IgG-IRDye800	610-132-121	ROCKLAND	secondary antibody
anti-Rat IgG-Alexa680	A21096	Invitrogen	secondary antibody
anti-Rb IgG-Alexa488	A11008	Invitrogen	secondary antibody
anti-Rb IgG-Alexa680	A21076	Invitrogen	secondary antibody
anti-Rb IgG-Cy2	ab6940	Abcam	secondary antibody
anti-Rb IgG-Cy3	AP132C	Sigma	secondary antibody
anti-Rb IgG-IRDye800	611-732-127	ROCKLAND	secondary antibody
DAPI	19178-91	Nacalai	

Table 4 使用したプライマーリスト 1

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	
M13_F	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	RNAプローブ
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	
FLAG_as	ACAAGGACGACGATGACAAG	FLAG-SMN_3-294
tol2_s	ATCGATGATGATCCAGACAT	
F-SMN_s	AGGACGACGATGACAAGATGAGCAGCGCGGCAG	
TAA-tol2_as	TAAATCGATGATGATCCAGACA	
SMN_MA+_s	CAAGATGGCGATGAGCAGCGCGGCAG	
SMN_MA+_as	AAGGACGACGATGACAAGATGGCGATGAGC	FLAG-SMN
tol2_as	ATGTCTGGATCATCATCGAT	SMN ΔN変異体
SMN_dN100_s	GGACGACGATGACAAGTCAGAAGACGGTTGCATTTAC	
SMN_d1_s	CGATGACAAGGATTCGACATTTGGGATGATACAG	SMN Δ1変異体
SMN_d1_as	GTCAGAATCCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAT	
SMN_d1-2a_s	ATGACAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTT	SMN Δ1-2a変異体
SMN_d1-2a_as	AGAGCATGCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAT	
SMN_d1-2b_s	GATGACAAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTT	SMN Δ1-2b変異体
SMN_d1-2b_as	AACTTCCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAT	
SMNdEx3_s	TCAGAAGACGGTTGCATTTACTT	SMN Δ3変異体
SMNdEx3_as	ACTTGGCTTTTCATTTTCATTCGTTGTAAGGAAGCTGCAG	
SMNdEx4_s	CCAGGTCTAAAATTCATGGCC	SMN Δ4変異体
SMNdEx4_as	CCATTGAATTTTAGACCTGGCTCTTGAGCATTCGTTCTATA	
TAA-tol2-s	TAAATCGATGATGATCCAGAC	SMN ΔC変異体
SMN_dC100_s	TCTGGATCATCATCGATTTAGAGAAAAGAGTTCCATGGAGC	
SMN_E134K_s	GGAAATAGAAAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	SMN E134K変異体
SMN_E134K_as	TTGCTCCTTTCTATTTCCATATCCAGTGTA	
SMN_Y272C_s1	GAGTGGCTGTCACTGGCTATTATATGGGTTT	SMN Y272C変異体
SMN_Y272C_as1	CAGTATGACAGCCACTCATGTACCATGAA	
SMN_C107A_GA_s	AAGACGGTGCCATTTACCCAGCTACCATTGCT	SMN C107A変異体
SMN_C107A_GA_as	GGTAAATGGCACCGTCTTCTGACCAAATGG	
SMN_C146A_GA_s	CCCAATCGCTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAG	SMN C146A変異体
SMN_C146A_GA_as	CTACTTCAGCGATTGGGAAAGTAGATCGG	
SMN_silent_s1	TGGCTGTATCTATCCGGCCACCATTGCTTCAATTGATTTAAGA	SMN siRNA 耐性変異体
SMN_silent_as1	AGGTTTAATATGTCCGACTTATTTCCAGGAGACCTGGAG	
SMN_silent_as2	GGCCGGATAGATACAGCCATCTTCTGACCAAATGGCAGA	
SMN_silent_s2	GTCGGACAATATTAACCTAAATCTGCTCCATGGAACCTCT	
SMN_silent_s1	TGGCTGTATCTATCCGGCCACCATTGCTTCAATTGATTTAAGA	
SMN_silent_as1	AGGTTTAATATGTCCGACTTATTTCCAGGAGACCTGGAG	SMN siRNA 耐性変異体
SMN_silent_as2	GGCCGGATAGATACAGCCATCTTCTGACCAAATGGCAGA	
SMN_silent_s2	GTCGGACAATATTAACCTAAATCTGCTCCATGGAACCTCT	

Table 5 使用したプライマーリスト 2

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	
TAA-tol2_s2	TAAATCGATGATGATCCAGACATGA	SMN 8CA変異体
SMN_as4	TCACCATTCTTTAGAGCATGCCTT	SMN 6CA変異体
SMN_s9	ACAGATGAAAGTGAGAACTCCAG	SMN N-3CA変異体 SMN C-3CA変異体
SMN_s10	CATGCTCTAAAGAATGGTGACAT	
tol2_as	TGTCTGGATCATCATCGATTTAA	
SMN_s11	TGTGGTTTACTGATATGGAA	
SMN_C231A_GA_s	CTATCAGCCTGGCTGCCTCCATTTCCCTT	SMN C231A変異体
SMN_C231A_GA_as	GCAGCCAGGCTGATAGTAAGTGGGGTGGTGG	
SMN_C250A_GA_s	CTCCCATAGCCCCAGATTCTCTTGATGATGCTGA	SMN C250A変異体
SMN_C250A_GA_as	GAATCTGGGGCTATGGGAGGTGGTGGGGGA	
SMN_C289A_GA_s	AGGAAGGGCTCACATTCCTTAAATTAATCGATGATG	SMN C289A変異体
SMN_C289A_GA_as	AATGTGAGGCCCTTCCTTCTTTTGATTTTGTCTG	
pGEX-6P-1_SMN_E3_s1	GTTCCAGGGGCCCTGTGGAAAGTTGGGGACAAATG	SMN exon3 大腸菌発現用
pGEX-6P-1_SMN_E3_as1	AGTCACGATGCGGCCGTTACTCTTGAGCATTCTGTTCTATATAT	
COIL-s1	CTTCCGTTGAGCACCAAG	Coilinクローニング
COIL-s3	CTGACGACTGCTACTTGATG	
primer71	GCTGCCATCGTAGAATCGAGACCGAGGAGA	V5-Coilin
primer72	CTGCCTAAATCGATGATGATCCAGACATGATAAGA	
primer73	ATTCTACGATGGCAGCTTCCGAGACGGT	
primer74	TCATCGATTTAGGCAGGTTCTGTACTTGATGT	
primer44	GACACCATGGCAGGTTCTGTACTTGATG	FLAG-Coilin-mRuby2
primer45	TGTACAAGTAAATCGATGATGATCCAGACA	
primer46	AACCTGCCATGGTGTCTAAGGGCGAAGA	
primer47	TCGATTTACTTGTACAGCTCGTCCATCC	
tol2_as2	CATGGATCCGTCGAGGAATT	Coilin GGGs*5 mRuby2
mRuby2_s2	ATGGTGTCTAAGGGCGAAGA	
primer67	CTCACCATAGGTCCAGGGTTCTCCTCCA	FLAG-Coilin ΔN
primer68	ACAAGTAAATCGATGATGATCCAGACATGATAAGATAC	
primer36	TTGGGTGTTGGTTCAGTTTCTTCACCTT	FLAG-Coilin ΔIDR
primer37	CTGAACCAACACCCAAGAAGGACTATAG	
primer30	ACAAGGCTTGGTTCAGTTTCTTCACCTT	FLAG-Coilin Δ1
primer31	CTGAACCAAGCCTTGTAAAGCCAAAAG	
primer32	AAGCATTGGTTTCTAGCAGAACCCTTTTG	FLAG-Coilin Δ2
primer33	CTAGAAACCAATGCTTGATGTCATCGAG	
primer34	CTTCCTAAGTCGTCTGACTCTGCACTAG	FLAG-Coilin Δ3
primer35	CAGACGACTTAGGAAGAGGATGGGGTAG	
primer85	CTGCTAGTCATCCTGTTCTGTGTTGTAATAGAA	FLAG-Coilin ΔRG
primer86	ACAGGATGACTAGCAGGGAGAGACACTGG	

Table6 gBlocks Gene Fragment で注文した配列

gBlocks	配列 (5'-3')	
Coilin GGS*5 mRuby2	GAATTCCTCGACGGATCCATGGCAGTTCGAGACGGTTAGGCTACGGCTTCAATTTGATTA CCCGCCCCAGCTACCCCGCACTGTACGGCTTCTGGCTTCTGGTCGACTTGAACAGATGCC GAGTCGTACAGATCTCATTAGTCTCATCCGCCAGCGCTTCGGCTCAGTCTGGGGCCCTC CTAGGCTCTACCTGGAGGGGGGGCTTTCGCCCCCGCCGAGAGCGCGCCCTTGTGAGAGA CAACGACTGCCTCAGAGTTAAATTTAGAAGAGAGAGGAGTTGCTGAGAATTCGTAGTCATCA GTAATGGTGACATTAATTTATCTCTTAGAAAAGCAAAGAGCGGGCATTTAGTTAGAGGAG GGTGAAGAACTGAACCAGATTGCAATATTTCAAAGAAGCATTGGAAGAGTCGAGAGAACAA TAAACAATAATGAGAAGGCTTGGATCTGGAACCAAAAGCTGTCACAGATCAGACTGTCAGCA AAAAAACAGAGAAAAATAAAGCAACCTGTGGCACAGTGGGTGATGATAACGAAGAGGCC AAAAGAAAAATCACC AAAAGAAAAGGAGAAATGTGAATATAAAAAAAGGCTAAGAATCCCAA GTCTCCGAAAGTACAGGCAGTGAAGACTGGGCCAATCAGAGATGTAGTTCTCCAAAAGGTT CTGCTAGAACAGCCCTTGTAAAGCCAAAAGGAAAGGTAGTGAAGCGTTTGCTCAAAGAG AGTCCCAGTTCCTCGGAGTCTGAATCTTGTGATGAATCTATCAGTGTGGTCCCAGCAA AGTCACCTTTGGAGGCCAGAAATTCCTCAGAGAAATACCAACTGAGTTATCAAAGGAAGACA CCTCTACCAAAAATACAACCTGCAGACAACTGGCTATAAACTTGGCTTAGCTTACCCCTC AGCAAGGGCAAGACCTCTGGAACAACATCTCCAGTTCAGACTCTAGTGCAGAGTCAGACGA CCAATGTCTGATGTCTCAGCACCCCGGAGTGTGCTGCGGGTTTCTTAAAGACAGTAGGCC TTTTTCAGGAAAGGTCGTCAGGCCAGGCTGTCTACAGACTGCAGGTGCTGCTGGA TGGAGGCGTTCTGGCTCAAATGGTGGTGGACAGGCTCCTGGTCTTCTCCAGTGTGCTCT CCCTGCTAGTTTAGGAAGAGGATGGGGTAGAGAAGAGAACCTTTTCTTGGAAAGGAGCTA AGGGACGGGGCATCGGGGGAGAGGTCGAGGACGAGGGCATCCTGTTCTGTGTGTAAT AGAAGCACTGACAACAGAGGCCAACAGCAATTAATGACGTGGTAAAAAATTCATCTACTAT TATCCAGAAATCCAGTAGAGACCCCAAGAGGACTATAGTCTGTTACCACCTGTAGCAGCTG CCCCTCAAGTTGGAGAAAAGATTGCATTTAAGCTTTTGGAGCTAACATCCAGTTACTCTCT GATGTCTTGACTACAAGGAAGGAAGAAATTAAGCCAAATCCAGAGACCCAGCAAGTAGA TATAGAAATCTTTTCTACCTGCTTGTAGAGAACTGGGAAATTTGATTTAGTTTATC ACAATGAAAATGGAGCCGAGGTAGTGGAGTACGCTGTGACACAGGAGCAAGATCACTGTA TTTTGGAAAGAGTTGATTGACCCAAGACTGATTATTGAATCTCCAAGTAACACATCAAGTAC AGAACCTGCCCGTGGCGGAGTGGCGTGGTCTGGAGGCGGTTCCGGGGGAGGCAGCGGTG GCGGGTCAATGGTGTCTAAGGGCGA	Coilin GGS*5 mRuby2
hSMN1_all-CA	CATGCTCTAAAGAATGGTGACATTCGCCGAACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAG AAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAACTGTCAGCTTCCTTACAACAGTGGGA AAGTTGGGGACAAAGCCCTCTGCCATTTGGTCAGAAGATGGCGCCATCTATCCGGCCACCATT GCTTCAATTTGATTTAAGAGAGAAAACCGCGTTTGGTTTACACTGGATATGGAATAGAGA GGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTCCCAATCGCCGAAGTAGTAATAATATAGAACAGA ATGCTCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCT CCTGGAATAAGTCGGACAATATAAACCCTAAATCTGCTCCATGGAACCTTTTCTCCCTCC ACCACCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCATGGCC CACCACCGCCACCGCCACCACCACCACCCTTACTATCAGCTGGCTGCCTCCATTTCTCT TCTGGACCACCAATAATTCACCACCCTCCCATAGCCAGATTCCTTTGATGATGCTGA TGCTTTGGGAAGTATGTTAATTTCAATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGG GTTTCAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGCCCTCACATTCCTTAAATTAATCGATGATGAT CCAGAC	SMN 8CA変異体
hSMN1_CA-C98-C128	CATGCTCTAAAGAATGGTGACATTCGCCGAACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAG AAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAACTGTCAGCTTCCTTACAACAGTGGGA AAGTTGGGGACAAATGTTCTGCCATTTGGTCAGAAGATGGCGCCATCTATCCGGCCACCATT GCTTCAATTTGATTTAAGAGAGAAAACCTGTGTGTGGTTTACACTGGATATGGAATAGAGA GGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTCCCAATCGCCGAAGTAGTAATAATATAGAACAGA ATGCTCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCT CCTGGAATAAGTCGGACAATATAAACCCTAAATCTGCTCCATGGAACCTTTTCTCCCTCC ACCACCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCATGGCC CACCACCGCCACCGCCACCACCACCCTTACTATCAGCTGGCTGCCTCCATTTCTCT TCTGGACCACCAATAATTCACCACCCTCCCATAGCCAGATTCCTTTGATGATGCTGA TGCTTTGGGAAGTATGTTAATTTCAATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGG GTTTCAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGCCCTCACATTCCTTAAATTAATCGATGATGAT CCAGAC	SMN 6CA変異体 SMN N-3CA変異体 SMN C-3CA変異体

## 第 1 章

### SMN のリサイクル過程の可視化に基づいた分離機構の解明

## 結果

### カハール体における SMN と Coilin の局在は多様である

SMN がカハール体から離れるメカニズムの探索のため、超解像顕微鏡を用いてカハール体内部での SMN と Coilin の分布を調べた。以前、カハール体での SMN と Coilin の局在は「ボールソケット状」と報告されたように<sup>61</sup>、カハール体内部で分離した局在が観察された (Figure 2A)。しかし、その分布には複数のパターンが存在していた。カハール体のサイズが小さいものでは SMN がグラニュー状で Coilin と重なるか並ぶ傾向があった。大きなカハール体では SMN はリング状に観察され、秩序だった分布となることが示唆された。

以前の報告<sup>61</sup>では SMN はリング状に観察されるとは述べられておらず、SMN のリング状の染色が今回使用した抗体に特異的な染色なのではないかと予想した。そこで Figure 2A で用いた SMN clone8 モノクローナル抗体のほか、SMN のポリクローナル抗体、以前の報告<sup>61</sup>で使用された SMN 2B1 モノクローナル抗体を用いて抗体染色、超解像顕微鏡で観察を行った。全ての抗体で一貫してリング状の局在が見られたが、クローン 2B1 を用いた場合にはリングの形状がより粗くなっていた。SMN の欠失変異体 (Figure 2C) を HeLa 細胞に発現させ各 SMN 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、エピトープの違いが明らかになり、リングの鮮明さはエピトープの違いによるものと考えられた (Figure 2D)。Coilin が SMN から分離して輝点を形成する場合、抗 Coilin 抗体は輝点の全体を染色した。注目すべきは、カハール体で Coilin が SMN と完全に重なり合ってリング状構造を形成している場合、抗 Coilin 抗体も抗 SMN 抗体と同様に染色されることである。このことは、リング状構造の染色されない中心領域が何らかの形で抗体のアクセスを妨げていることを示唆しているが、SMN がこのようなリング状構造を示す場合にのみ起こることであり、この構造は SMN によるものであることを意味している。

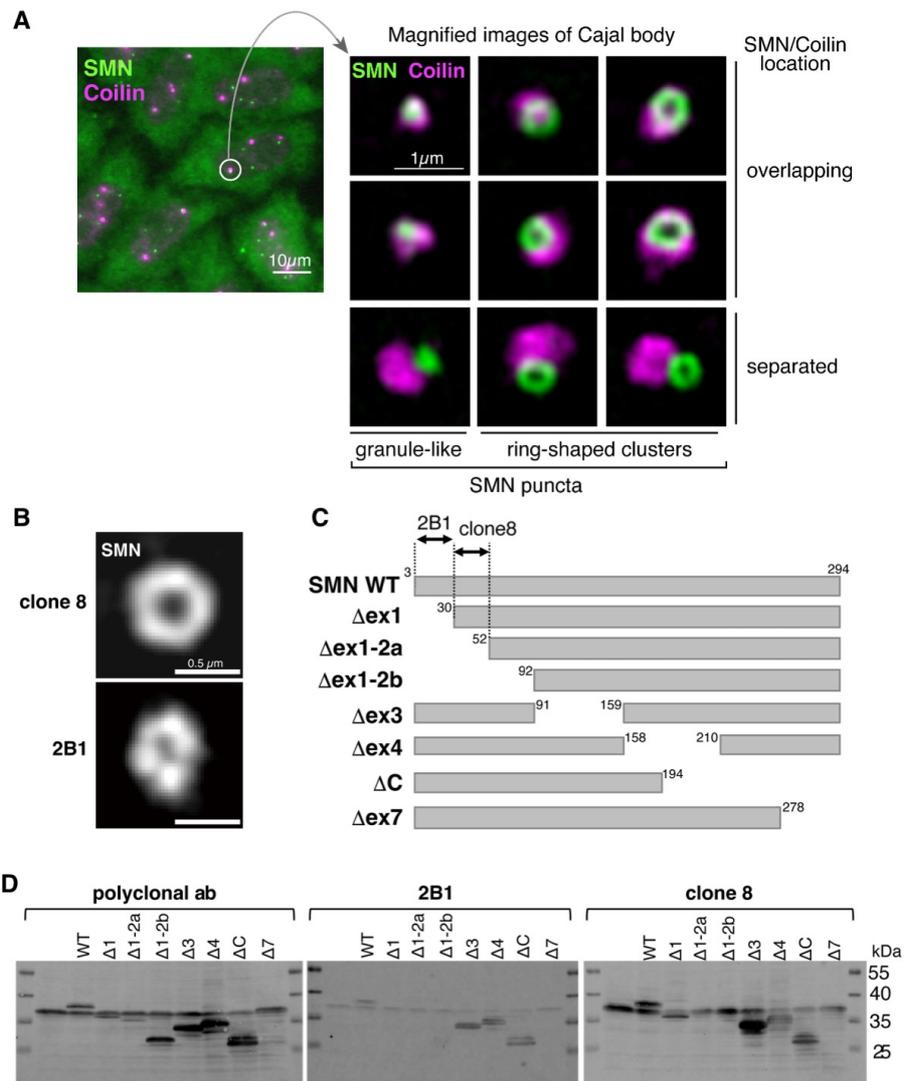


Figure 2

カハール体内部での SMN と Coilin の微細構造は多様である

(A) (左) 固定した HeLa 細胞を抗 SMN 抗体 (緑) と抗 Coilin 抗体 (マゼンダ) で二重染色を行い、カハール体と Gem を可視化した。(右) 固定した HeLa 細胞の SMN と Coilin が局在するカハール体を抗 SMN 抗体 (clone8) (緑) と抗 Coilin 抗体 (マゼンダ) で染色し、超解像顕微鏡を用いて SIM 画像を得た。右に示すように SMN と Coilin の輝点の局在に基づき overlapping と separated に分類し、下に示すように SMN の輝点の形態に基づき granule-like と ring-shaped clusters に分類した。(B) 固定した HeLa 細胞のカハール体/Gem を clone8、2B1 の 2 つの SMN のモノクローナル抗体で染色し、超解像顕微鏡で観察した。(C) (D) それぞれの抗 SMN 抗体のエピトープを SMN の欠失変異体を用いたウェスタンブロットにより調べた。(C) 作成した SMN 欠失変異体の模式図。全ての変異体は SMN の N 末端側 2 アミノ酸を欠いている。Δex7 は SMN2 からの産物と同様に通常の終止コドンが存在する exon7 を欠き exon8 の 4 アミノ酸が追加される。(D) 2B1 は SMN の exon1 を欠く Δ1、Δ1-2a、Δ1-2b で検出されず exon1 がエピトープであり、clone8 は exon2a を欠く Δ1-2a、Δ1-2b で検出されず exon2 がエピトープであった。

また、SMN や Coilin と比較して、カハール体内の U2 snRNA の位置を *in situ* hybridization により可視化した (Figure 3A, B)。SMN は snRNP とともにカハール体に輸送されると考えられているが、U2 snRNA は SMN と一致せず、隣接していた (Figure 3A)。一方、Coilin は常に U2 snRNA と重なるように検出された (Figure 3B)。同様のパターンは U1 snRNA と scaRNA でも観察された (データ未提示)。snRNP が Coilin と部分構造で共存することは、snRNA の成熟におけるカハール体の機能と一致する。

カハール体内の SMN や Coilin の配置が多様であるという結果は、カハール体の成熟あるいは SMN のリサイクル経路のステップを反映している可能性がある。しかし、これらの異なるパターンの出現順序は不明であった。

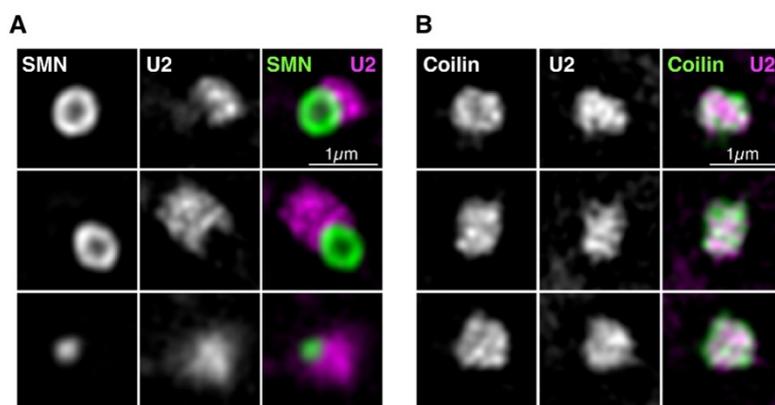


Figure 3

#### U2 snRNA は Coilin と共局在する

超解像顕微鏡を用いて取得したカハール体の SIM 画像。固定した HeLa 細胞で (A) U2 snRNA FITC プローブ、(B) U2 snRNA DIG プローブを用いて *in situ* hybridization を行い、(A) 抗 FITC 抗体と抗 SMN (clone8) 抗体で U2 snRNA と SMN、(B) 抗 DIG 抗体と抗 Coilin 抗体 U2 snRNA と Coilin を二重染色した。U2 snRNA の輝点は Coilin の局在と一致し、SMN とは隣接して観察された。

#### 核小体周囲コンパートメント (PNC) への Coilin 転位を誘導する化合物としてのハルミンの同定

我々は以前、スプリットルシフェラーゼアッセイに基づく化学ライブラリーのスクリーニングを行い、細胞内の U5 snRNP レベルを調節できる複数の化合物を同定した<sup>55</sup>。そして、これらの化合物が snRNP の成熟に関連する核内非膜オルガネラであるカハール体の形成に影響を与えるかどうかを調べた。その結果ハルマラ由来の  $\beta$ -カルボリンアルカロイドであるハルミンは、カハール体のマーカーとして頻繁に使われるカハール体の主要成分である Coilin のカハール体から peri nucleolar compartment (PNC) への移動を誘導した (Figure 4A)。Coilin の局在変化は、高濃度 ( $\sim 50\mu\text{M}$ ) のハルミン処理により観察され、曝露後 2 時間以内に開始した。また、3 種類のハルミンアナログである Harmaline、Harmane、Harmol による Coilin の局在も観察したが、ハルミンよりも PNC

に移行させる作用が弱かった (Figure 4A)。ハルミンは 3 つの異なる酵素である Monoamine Oxidase (MAO)、DYRK1A、トポイソメラーゼ I を阻害することで知られている。ハルミンのアナログも MAO を阻害するにもかかわらず、ハルミンアナログで観察された Coilin の PNC 転位がごくわずかであったことから、MAO 阻害は Coilin の PNC 転位に寄与していないと考えられた。さらに、DYRK1A 阻害剤 INDY<sup>62</sup> とトポイソメラーゼ I 阻害剤カンプトテシン (CPT) を用いて、Coilin の局在への影響を調べたところ、INDY による Coilin の局在変化は見られなかった (Figure 4B)。一方、CPT はハルミンと同様に PNC への Coilin 転位を誘導した (Figure 4B)。よって DYRK1A ではなくトポイソメラーゼ I の阻害が Coilin の PNC 転移に関与していると考えられた。

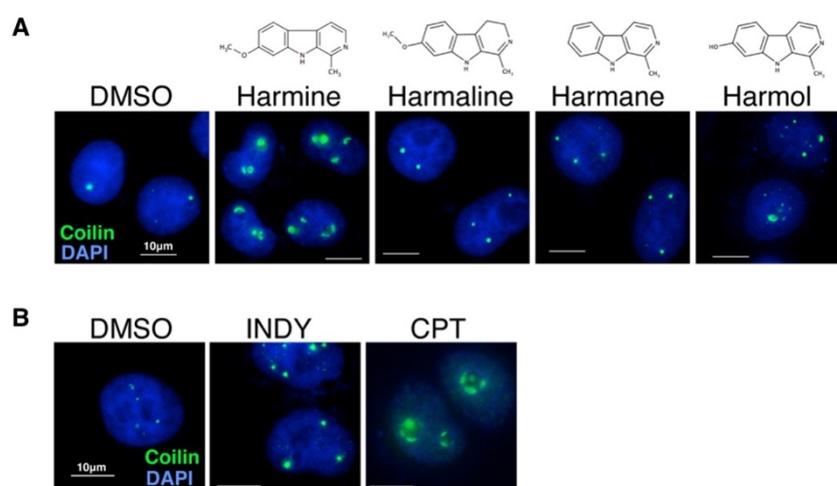


Figure 4

ハルミンにより Coilin が peri-nucleolar compartment (PNC) に転位する

(A) HeLa 細胞にハルミン (50  $\mu$  M)、ハルミンアナログである Harmalin (50  $\mu$  M)、Harmane (50  $\mu$  M)、Harmol (50  $\mu$  M) を 4 時間処理した後に固定し、抗 Coilin 抗体で染色し、Coilin の局在を観察した。構造式を上部に示した。(B) ハルミンと同一の作用標的を持つ化合物、DYRK1 の阻害剤である INDY とトポイソメラーゼ I の阻害剤であるカンプトテシン (CPT) で 4 時間処理した後に固定し、抗 Coilin 抗体で染色し、Coilin の局在を観察した。

ハルミンのカハール体への影響をさらに調べるため、ほかのカハール体構成成分の細胞内局在を調べた。SMN タンパク質は snRNP とともに核内に取り込まれると、カハール体形成の開始に重要な役割を果たす。興味深いことに、ハルミンが Coilin の PNC 転位を誘導する条件下では、SMN は Coilin とは独立した輝点を形成し続け (Figure 5A)、これは寒冷ストレスやアクチノマイシン D 後に SMN が Coilin から分離する<sup>33</sup> 報告と同様であった。また、同様の SMN と Coilin の分離は、CPT 曝露でも観察された (Figure 5A)。

SMN は常に Gemin2 とヘテロ二量体を形成している<sup>63</sup>。ハルミン処理後、Gemin2 は SMN と同様に、Coilin から分離した核内の輝点が観察された (Figure 5B)。Nopp140 は

核小体とカハール体に存在するタンパク質であり<sup>64</sup>、ハルミン処理後には PNC に移行し Coilin の局在と一致していたが、SMN の輝点からは明らかに離れていた (Figure 5C、D)。Fibrillarin は、核小体とカハール体に存在するタンパク質である。ハルミン処理により、Fibrillarin の局在は核小体に顆粒のような構造を示した。この状態では、Coilin で標識された PNC が、Fibrillarin で染色された核小体構造の周囲に観察された (Figure 5E)。

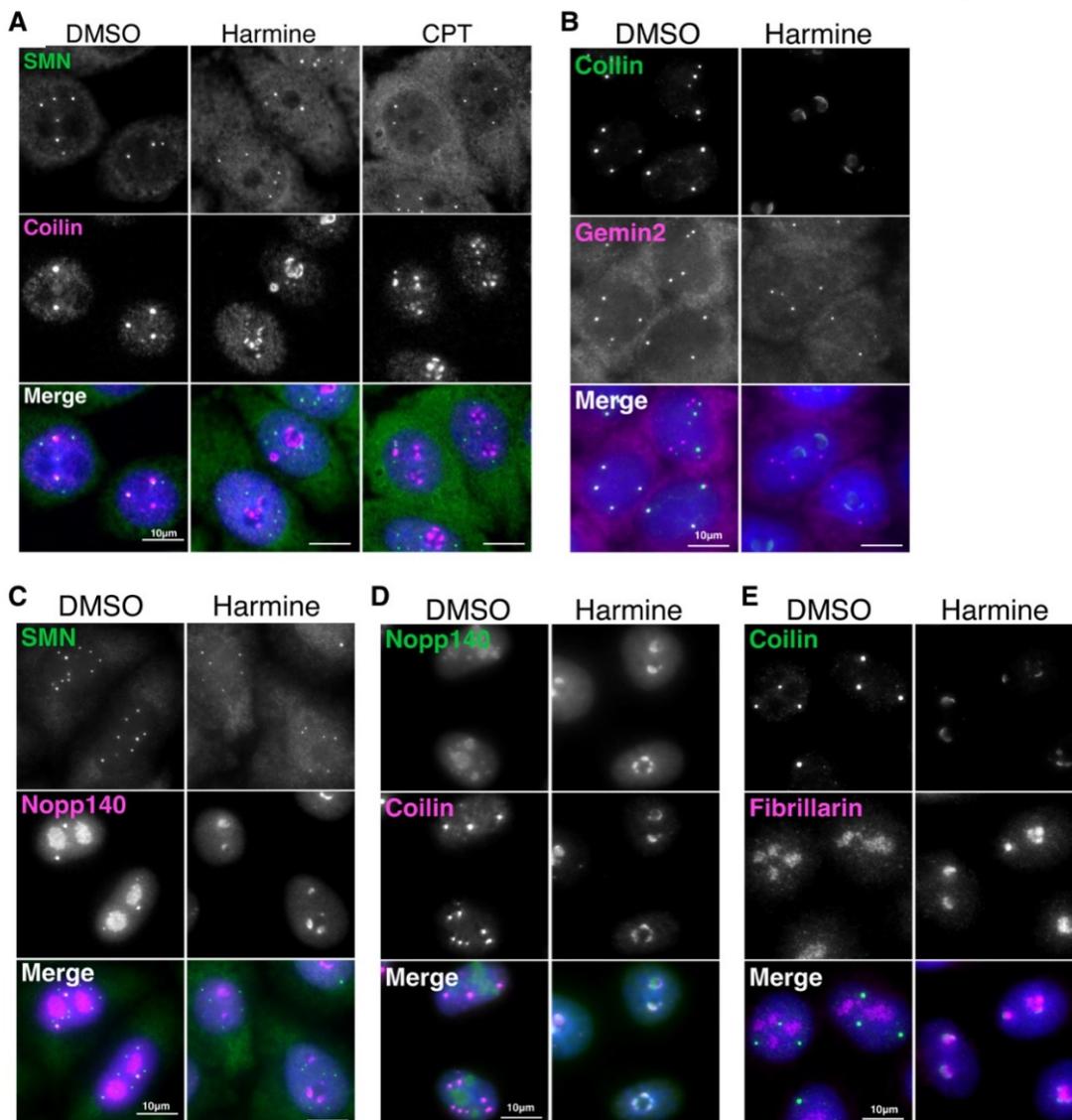


Figure 5

#### ハルミン処理後のカハール体局在タンパク質の局在

HeLa 細胞にハルミン (50  $\mu$ M) で 3 時間処理した後に固定し、カハール体に局在するタンパク質の二重染色を行った。(A) SMN と Coilin、(B) Coilin と Gemin2、(C) SMN と Nopp140、(D) Nopp140 と Coilin、(E) Coilin と Fibrillarin の染色を示した。SMN と Gemin2 は PNC に転位せず、Nopp140 はカハール体と PNC のどちらでも Coilin と共局在した。Fibrillarin はハルミンにより局在が変化するが、Coilin の PNC より広範囲な核小体に局在した。(A) HeLa 細胞にカンプトテシン (50  $\mu$ M) で 3 時間処理した後に固定し Coilin と SMN の二重染色を行った。カンプトテシン処理でも Coilin が PNC に移行し、SMN は移行せず核内で輝点を形成した。

さらに、U2 snRNA のプローブを用いて U2 snRNA の分布も調べた。ハルミン処理によって Coilin が PNC に転位すると、snRNA の輝点は消失することが明らかになった (Figure 6A、B)。このことから、抗 SMN 抗体によって検出されたハルミンで誘導される SMN の輝点は、SMN と Gemin 複合体を含む Gem と類似しているが、Coilin と snRNA を含まないことが示唆された。またハルミン処理後の Coilin と SMN のタンパク質レベルをウェスタンブロットで評価したところ、タンパク質発現に変化は見られなかった (Figure 7)。

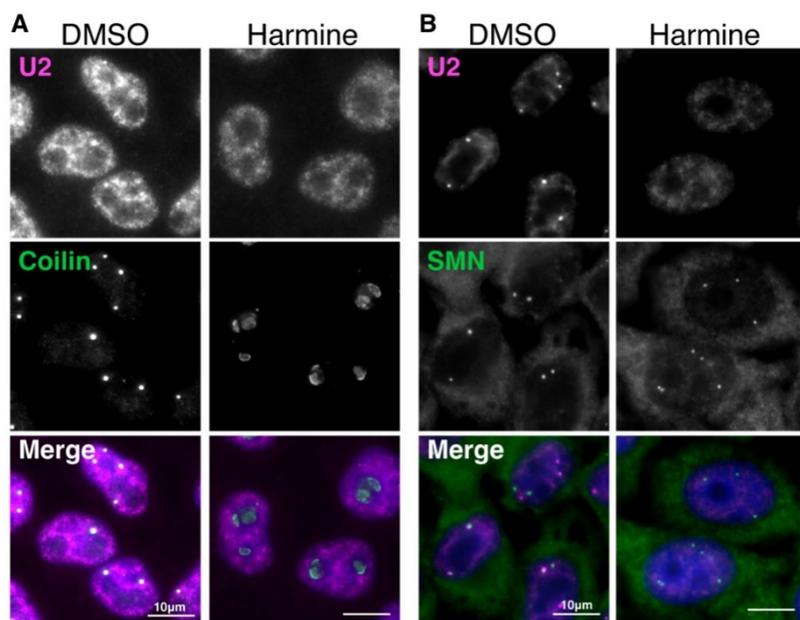


Figure 6

ハルミン暴露後のカハール体および PNC におけるカハール体構成タンパク質 Coilin、SMN と U2 snRNA の共局在解析

ハルミンを 50µM で 3 時間処理した後、Coilin と SMN を両抗体と U2 snRNA の FISH プローブを用いて以下の組み合わせで二重染色した: U2 snRNA と Coilin (A)、U2 snRNA と SMN (B)。ハルミン暴露後、U2 snRNA のカハール体における輝点は消失し、同時に Coilin は PNC に移動した。

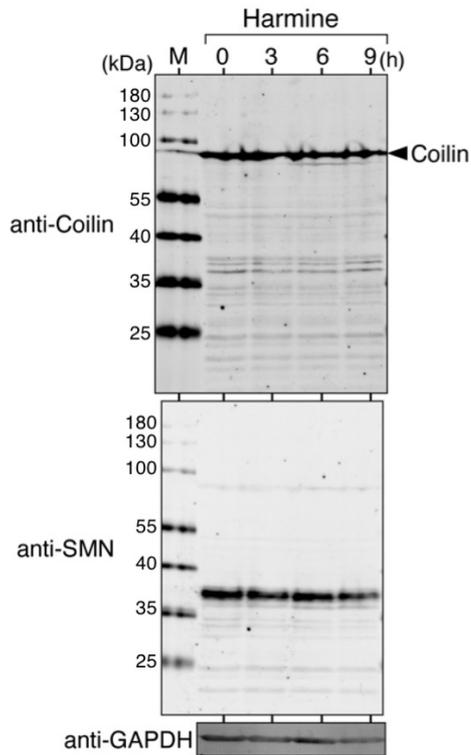


Figure 7

ハルミンは SMN と Coilin のタンパク質発現に影響を与えなかった

ハルミン曝露後の内因性 Coilin と SMN の発現を、抗 Coilin 抗体（上段）と抗 SMN 抗体（中段）で検出した。Coilin と SMN とともに、発現量やバンドの位置に変化は観察されなかった。GAPDH をローディングコントロールとして用いた（下段）。

### ハルミンによって誘導された Coilin の PNC 転位は可逆的である

次に、ハルミンの除去によって細胞がカハール体を再構成できるかどうかを調べた。Figure 8 に示すように、ハルミン処理を 3 時間行ったのち、培地を除去し PBS で洗浄した後、新たな培地で培養を行い、局在の観察を行った。その結果ハルミン除去後 30 分で PNC から Coilin が急速に消失し、小さなカハール体が再構成されることが示された (Figure 8A, B)。しかし、ハルミン除去後も、Coilin が結合していない Gem 様構造が残存しており (Figure 8B)、カハール体再形成は必ずしも Gem を足場としていないことが示唆された。その代わりに、Coilin と SMN の両方をほぼ同じサイズで含む小さなカハール体が観察されたことから、これらの小さなカハール体は、両タンパク質が同時に会合することにより、*de novo* で再構成された可能性が高いことが示唆された。カハール体と PNC の間のこのような Coilin の再配置は、CPT 除去後にも観察されたが、その回復はハルミンに比べ時間がかかった (Figure 8C, D)。

興味深いことに、U2 snRNA のシグナルは、120 分の回復培養後でも、新しく形成されたカハール体では観察されなかった (Figure 8E)。このことは、核内の SMN と Coilin が、新たに輸入された snRNP を必要とせずに、カハール体形成を誘導することを示唆している。

## SMN は、新たに形成されたカハール体の拡大とともに、クラスター様分布へと進行する

この時間経過とともに、超解像顕微鏡を使ってカハール体を詳細に観察した。ハルミン処理後、カハール体から Coilin が急速に消失することから、これらの点刻は、カハール体から Coilin が動的に交換される相分離液滴である可能性が高い<sup>65,66,67</sup>。逆に、SMN のクラスター分布 (Figure 5C) は、より硬直的で構造化された相互作用を反映しているのかもしれない。

ハルミン除去から 30 分間の回復培養後、SMN と Coilin が共局在化した体は、新たに組み立てられたカハール体と推定されるが、SMN と Coilin の 2 つの類似したサイズの輝点が重なった構造として観察された。120 分の回復期間の後、SMN と Coilin の両方からなる大きな構造体の増加が観察され、特に SMN の輝点は、リング状の形状を示した (Figure 8F)。このことは、カハール体が回復した後、SMN 凝集体がより組織化された構成へと進むことを示唆している。注目すべきは、ハルミン暴露中に残存していたと思われる大きな SMN リング状構造体が、ハルミン除去後もまだ存在し、Coilin の小さな輝点が時々付着していることである。従って、これらの残存 SMN ボディのいくつかは、まだ Coilin と相互作用する能力を持っている。

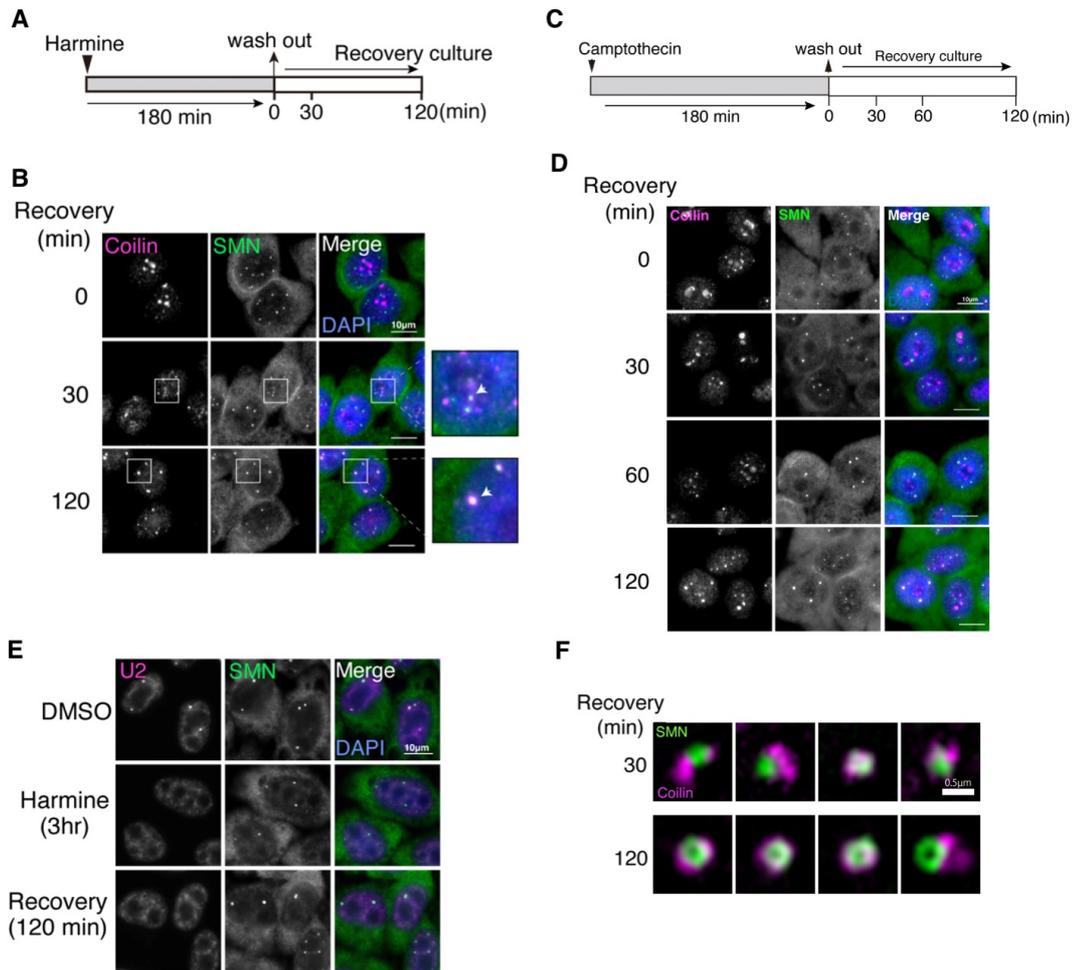


Figure 8

ハルミンを除去すると、Coilin は速やかにカハール体を再構築する

(A) ハルミン除去後の回復培養の時間経過の模式図。HeLa 細胞で実験を行い、各時間で固定し染色した。(B) A の通りに固定した HeLa 細胞でのハルミン除去の回復培養後の抗 Coilin 抗体 (マゼンダ) と抗 SMN 抗体 (緑) を用いた二重染色。矢印は新しく形成されたカハール体を示し、Coilin と SMN の両方の抗体で標識されている。ハルミンの洗浄後、Gem はしばしば残存した (矢頭)。(C) カンプトテシン除去後の回復培養の時間経過の模式図。HeLa 細胞で実験を行い、各時間で固定し染色した。(D) C の通りに固定した HeLa 細胞でのカンプトテシン除去の回復培養後の抗 Coilin 抗体 (マゼンダ) と抗 SMN 抗体 (緑) を用いた二重染色。カンプトテシンの効果はハルミンの効果よりわずかに強く、ハルミンと比較して、洗浄後 60 分経過しても PNC 周辺に Coilin が存在する。(E) A の通りに固定した HeLa 細胞で U2 snRNA FITC プローブを用いて *in situ* hybridization を行い、抗 FITC 抗体と抗 SMN (clone8) 抗体で U2 snRNA と SMN を二重染色した。U2 snRNA は 120 分の回復培養後でもカハール体に検出されなかった。(F) A のハルミン処理からの回復培養でのカハール体の SIM 画像。SMN は通常、回復培養 30 分後に顆粒様構造を示した。しかし、120 分間の回復培養後、リング状のクラスターがより目立つようになった。

Coilin の局在に対するハルミンの効果は、Coilin-mRuby2 を一過性に発現させた HeLa 細胞のライブイメージングによって捉えられた (Figure 9A)。カハール体からの Coilin 流出と PNC への蓄積は同時に起こった。ハルミン除去後、PNC からの Coilin の急速な流出は顕著であったが、いくつかの残存 Coilin は PNC の先端に局在した。残存した Coilin は、新たに形成されたカハール体と比較して、しばしば大きな輝点を形成した。Figure 3A に示した、免疫染色による内在性 Coilin と SMN の画像と比較すると、SMN はこの残存 Coilin の点刻にほとんど集中しなかったが、Nopp140 は Coilin と共局在していた (データ未提示)。

また、アクチノマイシン D によって誘導された Coilin の PNC の移動は急速であったが、不可逆的であった (Figure 9B)。

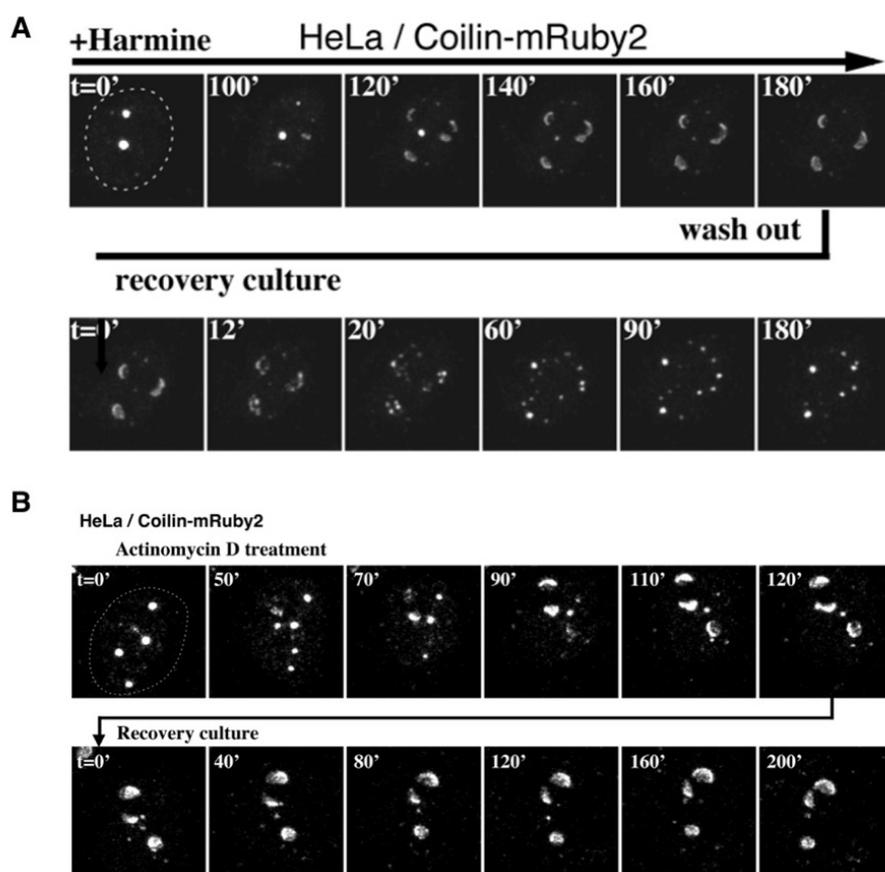


Figure 9

#### mRuby2 を融合させた Coilin の化合物処理時、回復培養時のライブイメージング

(A)mRuby2 を融合させた Coilin を発現させた HeLa 細胞でハルミン処理、wash を行い回復培養を行ったライブイメージングのスナップショット。破線は核の境界を示す。6 時間（ハルミン処理と回復のために各 3 時間に分割）にわたって細胞を共焦点顕微鏡で 2 分ごとにスキャンした。実験の両段階において、Coilin の局在の急激な変化が観察された。(B)mRuby2 を融合させた Coilin を発現させた HeLa 細胞で Actinomycin D 処理、wash を行い回復培養を行ったライブイメージングのスナップショット。破線は核の境界を示す。6 時間（Actinomycin D 処理を 2 時間と回復のために 4 時間に分割）にわたって細胞を共焦点顕微鏡で 2 分ごとにスキャンした。Actinomycin D 処理により PNC に移行した Coilin は回復培養によりカハール体を再構成せず、不可逆であった。

#### SMN または Coilin のいずれかを過剰発現させると、ハルミンに対する反応が変化する

SMN と Coilin の動きを同時にモニターすることを目的として、蛍光タンパク質と Coilin の融合タンパク質 (Coilin-mRuby2) を HeLa 細胞に一過性に過剰発現し、内在性 SMN の局在を確認した。予期せぬことに、Coilin を過剰発現させると、ハルミン処理によって SMN が PNC に動員され、これは小さなタグである V5 tag と Coilin の融合タンパク質 (V5-Coilin) を用いても観察された (Figure 10A 左、中央)。同様に SMN の過剰発現は、ハルミン存在下で、SMN 自身の PNC への移動、あるいは SMN を含むカハール体からの Coilin の PNC への移行を阻害した (Figure10A 右、Figure11A 上)。なお、Coilin または SMN と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させると、SMN の PNC に移動が小さいタグとの融合タンパク質の発現時よりも多く観察された。

さらに、超解像顕微鏡でこれらの融合タンパク質を発現させた際のカハール体の Coilin と SMN の微細構造を観察した。小さいタグである V5-Coilin や FLAG-SMN 発現時では SMN と Coilin が構造体内で混ざるものも見られたが、SMN と Coilin が内在と同様に分離している構造が観察されるものが多く見られた (Figure 10B、Figure12B)。しかし Coilin または SMN に蛍光タンパク質を結合させた Coilin-mRuby2 と EGFP-SMN の発現時では、Coilin と SMN の輝点は分離して見えず、それらは一つの構造内で混在しているように見えた (Figure 10B)。この観察から、SMN と Coilin の分離は、両分子の濃度が均衡し、これらのタンパク質が大きなタンパク質の結合により構造的に制約を受けない場合にのみ起こることが示唆された。

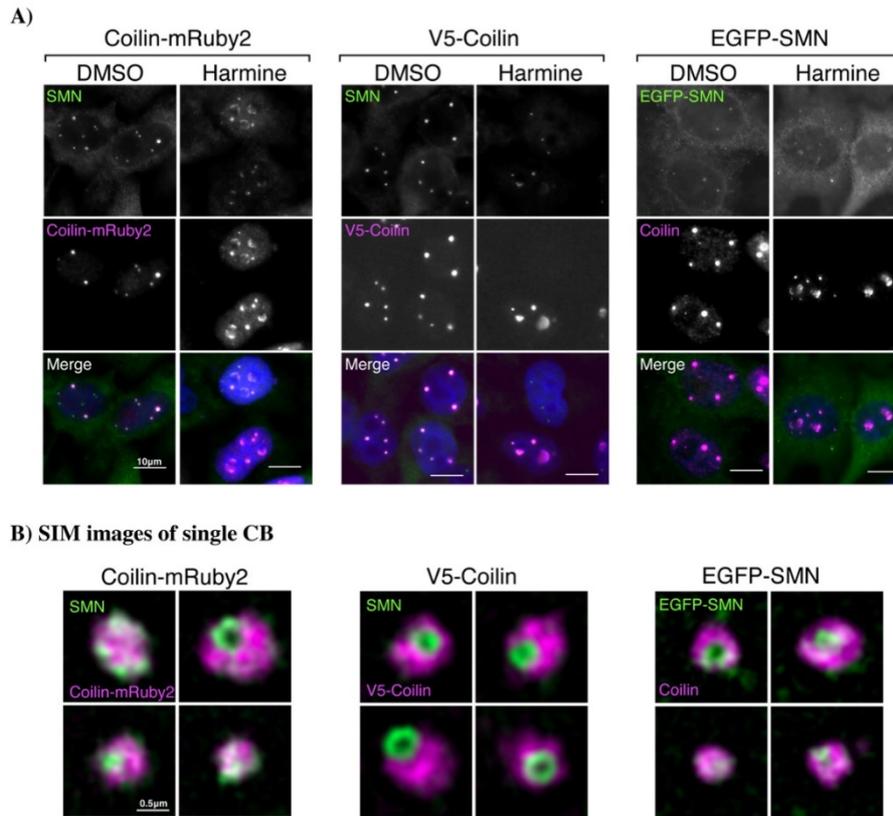


Figure 10

SMN または Coilin のいずれかを過剰発現させると、ハルミン処理後、SMN が PNC に動員される

(A) 内在性 SMN の局在を検出するために、Coilin-mRuby2 または V5 タグ付き Coilin を発現する細胞を抗 SMN 抗体で染色した。EGFP-SMN を発現する細胞を抗 Coilin 抗体で染色し、内在性 Coilin の局在を検出した。SMN はハルミンの非存在下でも存在下でも Coilin と重なった。ハルミン暴露後は、カハール体に加えて SMN も PNC で観察された。(B) 超解像顕微鏡で得られたカハール体の画像から、Coilin-mRuby2 または EGFP-SMN のいずれかをトランスフェクトした細胞では、SMN と Coilin の点刻の分離は起こらないことが示された。

## ハルミンを用いた共局在アッセイにより、SMN は tudor ドメインを介して Coilin と相互作用することが明らかになった

しかし我々は、FLAG tag 融合 SMN の過剰発現を用いると、ハルミン処理後の共局在の持続性をモニターすることで、Coilin との相互作用を可視化できることを示した。SMA に関連する SMN の変異は、SMN の tudor ドメインと YG ボックスという 2 つのドメイン内で起こることが多い<sup>47</sup>。tudor ドメイン内の変異は、Coilin と Sm タンパク質の RG ボックスにおいて対称的にジメチル化されたアルギニン (SDMA) と結合することによって相分離を促進する tudor ドメインの機能を損ない、YG ボックスの変異は SMN の多量体化に必須である C 末端 YG ボックスの機能を損なう<sup>49</sup>。各ドメインの E134K と Y272C という、よく研究されている 2 つの変異について、ハルミン処理に対する反応を調べた。

Figure 11 に示すように、野生型 SMN の FLAG tag 融合タンパク質 (SMN WT) の過剰発現は、ハルミン処理により SMN の PNC 転位または、SMN を含むカハール体への Coilin の局在が誘導された。しかしながら、tudor ドメインを介して Coilin と結合する能力を欠く SMA に関連した変異体である E134K 変異体は、Coilin をカハール体に局在させることが全くできなかった。Figure 11A のハルミン処理後の染色より Figure 11B のように SMN と Coilin の局在パターンを分類しカウントをした結果を 11C に示した。これを SMN が PNC に移行するもの、Coilin が SMN と共にカハール体に留まるもの、Coilin が PNC に移行し SMN が輝点を形成するものにグループわけをし、Figure 11C 下にグラフを示した。Figure 11C より SMN WT を発現している細胞の約 60%は、ハルミン処理によって SMN と Coilin の両方が PNC に移行することを示したが、SMN E134K を保有する細胞ではその数は 25%に減少した。また SMN の C 末端の YG ボックスの多量体形成能を欠く変異体 Y272C も評価した。この変異体は SMN WT の挙動を反映していたが、SMN の PNC 移動よりもむしろカハール体に Coilin を固定する方を好み、このような細胞の数はほぼ 2 倍に増加した。

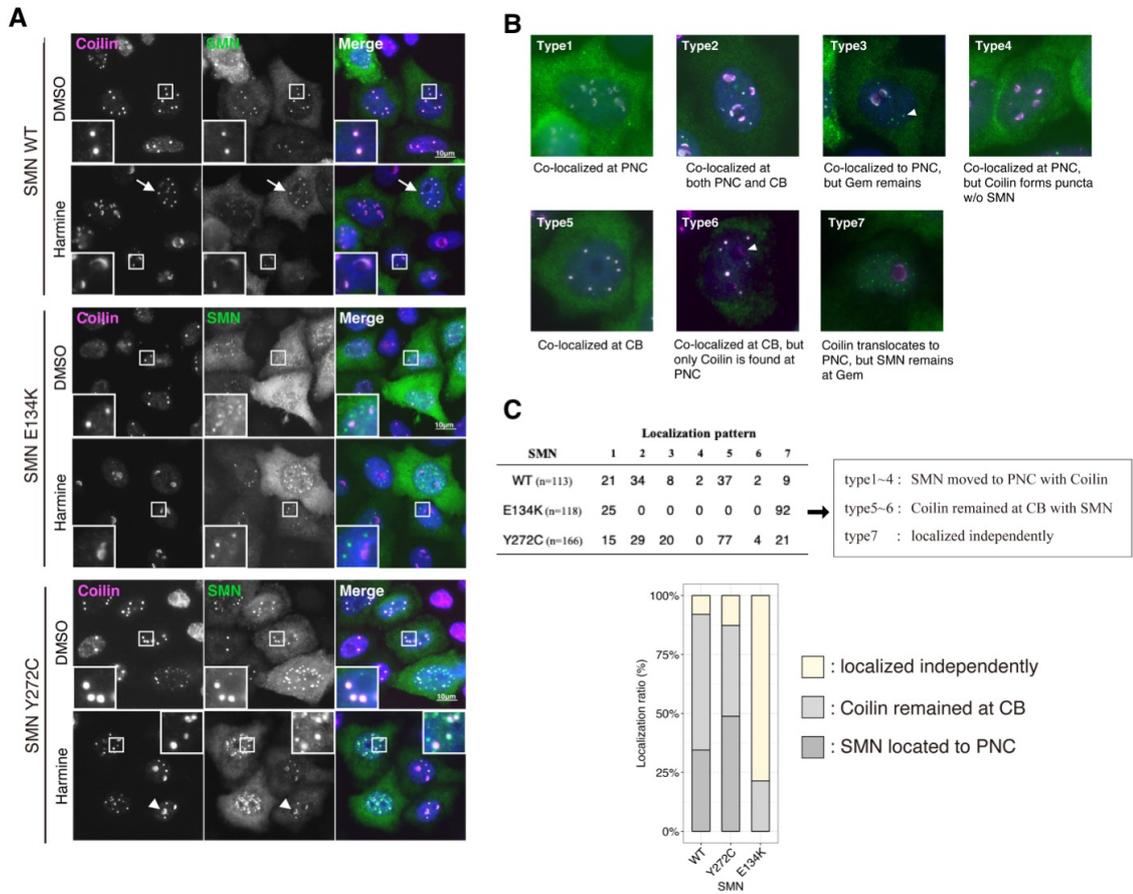


Figure 11

ハルミンによる局在変化に基づく、Coilin と過剰発現 SMN の細胞内相互作用の検出

(A) SMN に導入された変異はパネルの左側に示されている。上下のパネルはそれぞれコントロール (DMSO) とハルミン (50  $\mu$ M, 4 時間) で処理した細胞を示す。矢印はカハール体を、矢頭は PNC (抗 Coilin 抗体により検出) を示す。SMN に対応する抗 FLAG 標識も示した。白い四角で示した部分を拡大した。SMN WT と Y272C を発現する細胞では、カハール体と PNC の両方に Coilin と SMN が存在する。SMN WT は PNC でしばしば Coilin と共局在し、カハール体ではあまり共局在しなかったが、Y272C はハルミン処理後も主にカハール体に留まり、Coilin と共局在した。E134K の局在は、ハルミン処理にかかわらず、Coilin から独立していることが観察された。(B) ハルミン処理後の過剰発現 SMN と Coilin の共局在パターンによりタイプ 1-7 に分類した。(C) 共局在パターンを(B)に従って分類し、表に Type1-7 の共局在パターンを持つ細胞の数を示した。棒グラフは、SMN が Coilin とともに PNC に移動した Type1-4、Coilin が SMN とともにカハール体に留まった Type5-6、そして Type7 はそれぞれ独立に局在したものとして作成した。

## SMN Y272C 変異体の過剰発現は、snRNA が保持されている Coilin と混在して分布する異常なカハール体の形成を引き起こす

興味深いことに、SMN WT を高発現させた細胞は大きな細胞質顆粒を形成したが、SMN Y272C の場合、これらの顆粒は減少した (Figure 12A)。一方、Y272C の過剰発現によって生じた SMN の輝点は SMN WT よりも大きいことが観察され (Figure 12A)、輝点のサイズを定量した結果 SMN WT と比べ有意な差があることが示された (Figure 12B)。このことは、SMN Y272C 変異体は多量体化活性を欠いているが、それでもなお大きな凝集体を形成できることを示唆している。SMN Y272C 変異体における細胞質顆粒の減少は、Y272C 変異体がより各内で大きな輝点の形成を促進し、それによって SMN が核に隔離されたことを反映しているのかもしれない。

次に超解像顕微鏡を用いて、SMN WT と Y272C を含むカハール体の構造の違いを調べた。通常の大さのカハール体では、WT と Y272C の間に構造の違いは見られなかった (データ未提示)。SMN WT 発現細胞は一部では内在のカハール体よりも大きなカハール体が形成されたが、これらでは SMN と Coilin のリング状の形状で観察され完全に一致していた (Figure 12C)。一方 Y272C の発現によって形成された肥大化したカハール体はそれらよりもサイズが大きく、SMN は歪で不規則な形態を示した (Figure 12C)。また Coilin は Y272C の形成するカハール体に一部が共局在しており、内在や野生型 SMN とは異なる挙動を示した (Figure 12C)。

通常、ほとんどの成熟したカハール体は、SMN と Coilin の分離した輝点が隣接した球体として観察され、snRNA は Coilin の輝点に共局在していた (Figure 3)。SMN の一過性の過剰発現細胞でも U2 snRNA を観察したところ、SMN WT では内在と同様の局在を示した (Figure 12D)。一方、Y272C 変異体による肥大し歪な構造体では、U2 snRNA は SMN と Coilin が形成するリング状の構造内に位置していた (Figure 12D)。これらの結果は、SMN がリング状構造体として Coilin から分離することが、snRNP を含む Coilin 液滴を形成するための重要なステップであることを示唆している。SMN Y272C を含む凝集体は、SMN から Coilin を分離することができず、両者の分離には多量体化が不可欠であることが明らかになった。

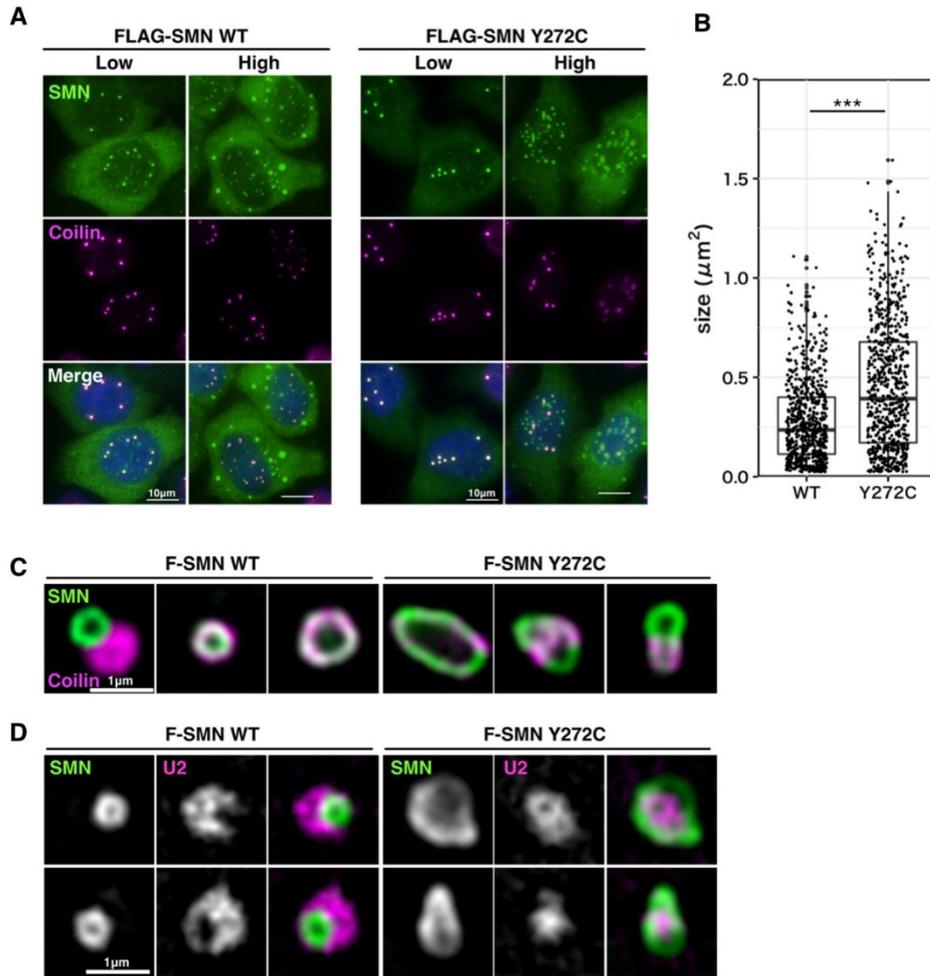


Figure 12

SMN Y272C の核内の輝点は拡大し、カハール体の形態は歪になる

(A) HeLa 細胞に FLAG-SMN WT、Y272C 変異体を発現させ 24 時間後にハルミン処理を行い、固定後、抗 FLAG 抗体（緑 SMN）と抗 Coilin 抗体（マゼンダ）で二重染色した。高発現した SMN WT は大きな細胞質顆粒の形成をもたらした（High）。対照的に、Y272C では WT に比べて細胞質顆粒が減少し、核内の輝点のサイズが拡大した。(B) WT と Y272C 発現細胞間の核内の輝点サイズの比較。有意差検定には Mann-Whitney U 検定を用い、p 値は  $4.57 \times 10^{-24}$  (\*\*\*) と表記。輝点の大きさは、共焦点顕微鏡で取得した Z スタックから作成した直交投影画像から算出した。実験は独立して 3 回行い、すべての実験から得られた定量化データは同様の傾向を示した。代表的なプロットを 1 つ示す。(C) SMN を抗 FLAG 抗体（緑）と内在の Coilin を抗 Coilin 抗体（マゼンタ）で染色したカハール体の SIM 像。WT は SMN と Coilin の明瞭な点状あるいは均一な共局在を示す（左のパネル）。Y272C も同様の構造を形成するが、より大きなカハール体は不規則なプレッツェル状の形状を示し、部分的に Coilin が共局在していた（右のパネル）。(D) 超解像顕微鏡で観察したカハール体における U2 snRNA の局在（SMN: 緑、U2 snRNA: マゼンタ）。Y272C 細胞では、snRNA はプレッツェル様構造体の中に局在していた（右のパネル）が、SMN WT 細胞では、snRNA の輝点は SMN の輝点から分離していた（左のパネル）。

最後に、tudor ドメインを介した SMN と Coilin の相互作用が、肥大し歪な非典型的な Y272C の構造体の構築に重要であるかどうかを調べるために、ハルミン処理による SMN E134K/Y272C 二重変異体の局在を調べた。タンパク質の発現レベルは、ハルミン処理後も変異体間で比較的一定であり (Figure 13B)、ハルミンに対する E134K/Y272C 二重変異体の応答は、E134K 変異体の応答と同じであった (Figure 13A)。したがって、tudor ドメインを介した SMN と Coilin の相互作用は、典型的なカハール体だけでなく、非典型的な Y272C 構造の組み立て段階でも役割を果たしていることが示された。

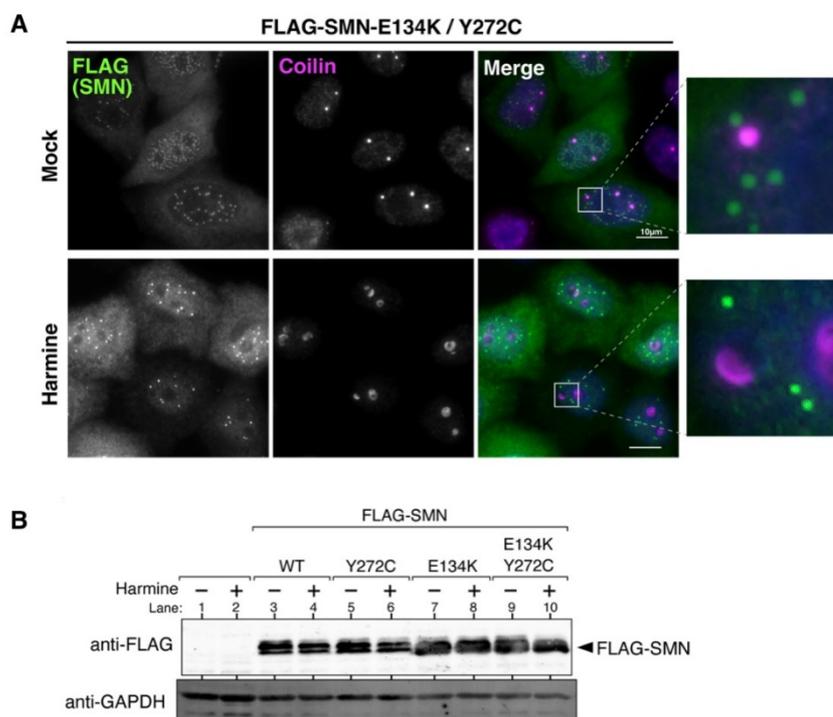


Figure 13

SMN E134K/Y272C 二重変異体の Coilin との相互作用の欠損。

(A) HeLa 細胞に E134K/Y272C 二重変異体を発現させ 24 時間後にハルミン処理 (50  $\mu$ M, 4 時間) を行い、固定後、抗 FLAG 抗体と抗 Coilin 抗体で二重染色した。E134K 単独の変異体と同様に、この二重変異体は、ハルミン処理とは無関係に、明確な Coilin の局在を示す。(B) SMN 変異体の発現レベルは、ハルミン存在下では変化しなかった。SMN はこの条件下では全てのサンプルで複数のバンドとして検出されたが、SMN E134K 変異体および E134K/Y272C 変異体は他の変異体よりも低いバンドを示し、これは以前の報告と一致している<sup>68</sup>。

## 考察

### SMNのカハール体からの脱離における多量体化の役割

SMN、Coilin、snRNA というカハール体の3つの主要な構成要素を検出することによって、カハール体の微細構造を可視化することを目的とした我々の超解像顕微鏡での観察では、SMN はしばしば Coilin と snRNA とは別の位置に配置されていることが明らかになった。しかし、SMN の輝点の形は大きさによって異なっていた。小さい SMN の輝点は粒状に見え、大きい輝点はリング状に観察された。これらの構造は、以前に報告された核小体の緻密な線維成分中の snoRNP の構造に似ており、クラスター化した分布と解釈された<sup>69</sup>。SMN のリング状の形状は、抗体での標識のアーティファクトかもしれないが、Coilin の輝点との明確な違いは、成分の規則だった配置を反映している可能性が示唆される。より大きなカハール体であるとリング状に観察されることはカハール体サイズの増大により SMN の濃度が高くなったことにより、SMN の YG モチーフを介した SMN の多量体化が誘導されたためではないかと推測される。観察結果より、多量体化機能喪失変異体である SMN Y272C 変異体では、このような多量体化によるリング状の構造への変化を破壊し、異常で不規則な形状の構造体が Coilin とともに形成され、この仮説を支持している。

さらに、snRNA は Coilin と完全に重なり合っているが、SMN とは重なり合っていないことから、この SMN のリング状構造への分離は、snRNP の放出と関連している可能性がある。SMN は tudor ドメインを介して snRNP の Coilin と Sm タンパク質の両方に結合し、SMN の C 末端ドメインは Sm タンパク質の1つである SmB タンパク質に結合することが示されている<sup>63</sup>。その結果、C 末端に位置する YG モチーフを介した多量体化は SMN と Sm タンパク質の結合を低下させ、snRNP の Coilin 液滴への放出を促進する役割も担っているのかもしれない。リング状構造における SMN のコンフォメーションが、Coilin と snRNP の相互作用面を制限しているかどうかを決定することは、興味深いことである。

### ハルミンによる Coilin の PNC 転位機構の可能性

我々は、ハルマラ由来の $\beta$ -カルボリンアルカロイドであるハルミンが、カハール体形成を解析するための効果的なツールとして役立つことを発見した。これまでにハルミンは核小体を丸くすることが報告されており<sup>70</sup>、これは rRNA プロセッシングを阻害する低分子化合物で一般的に観察される現象である<sup>71</sup>。重要なことに、ハルミンは二本鎖 DNA にインターカレートし、*in vitro* でトポイソメラーゼを阻害することができる<sup>72, 73, 74, 75</sup>。したがって、ハルミンは RNA ポリメラーゼ I を阻害するか、あるいはトポイソメラーゼ I や他のプロセッシング因子を阻害することによって、rRNA プロセッシングを阻害する可能性がある。また rRNA プロセッシングの阻害は核小体の構造変化を引き起こし<sup>76</sup>、

Nopp140 や Fibrillarin など、Coilin と結合する核小体タンパク質の再分布を引き起こす可能性がある。もう一つのトポイソメラーゼ I 阻害剤であり、rRNA プロセッシングも阻害するカンプトテシン<sup>71</sup>やハルミンアナログを用いた Coilin の局在観察では、ハルミンが他の化合物よりも強く Coilin の PNC への転移を引き起こすことが明らかになったが、これはおそらく rRNA プロセッシングを阻害するのに不可欠な構造的特徴によるものであろう。しかし、ハルミンによって影響を受ける rRNA プロセッシングの正確な段階はまだ不明であり、ハルミンが PNC 表面上の Coilin 結合タンパク質の出現を直接誘導し、それによって Coilin の PNC への転位を引き起こすなどの別のメカニズムが存在するかもしれない。

ツール化合物としてのハルミンの顕著な特徴は、その可逆的作用である。PNC に入出入りする Coilin の動態は著しく速く、これはカハール体が相分離した液滴であるという概念と一致する。ハルミン除去後のカハール体の再形成は、正常な集合過程を正確に反映しているかどうかは不明である。とはいえ、ハルミン処理によりカハール体が消失した際に、Gem 様構造が一貫して Coilin をリクルートしないという観察結果は、Gem が SMN と Gemin 複合体のリサイクル場所として機能していることを示唆しているのかもしれない<sup>32</sup>。それにしても、なぜ Gem 様構造中の SMN は豊富に存在するにもかかわらず、Coilin を効果的にリクルートしないのか、不可解である。上述したように、リング状構造における SMN のコンフォメーションが、Coilin との相互作用を制限しているのかどうかを決定することも、この疑問に対する答えになるだろう。

### ハルミンをツール化合物として用いた SMN 変異体の分子挙動の解析

我々はまた、ハルミンが SMN と Coilin の細胞内相互作用を可視化するための効果的なツールであることを実証した。SMN E134K 変異体の Coilin 結合における潜在的な欠損を、細胞内で視覚的に同定することは困難であった。SMN E134K 変異体は核内で小さな輝点を多数形成し、これらの輝点はしばしば Coilin に隣接して現れるからである。しかしながら、SMN E134K 変異体タンパク質は、ハルミン処理後に Coilin と共に PNC に移動しないことから、明らかに Coilin との相互作用がないことが示された。一方、SMN の YG ボックスの変異により多量体化活性を欠く SMN Y272C 変異体は、大きく不規則な形の輝点を形成した。この発見は以前の研究<sup>77</sup>とは異なっているが、以前の研究では GFP 融合タンパク質を用いていたため、この矛盾が説明できるかもしれない。SMN E134K 変異体も Y272C 変異体も、U1 snRNA 上での Sm コア集合を促進することができないことが報告されている<sup>20</sup>。これは、どちらの変異体も正規のカハール体を形成しないという観察結果と一致する。野生型の SMN タンパク質と比較して、Y272C 変異体は細胞質顆粒が減少し、核内の輝点サイズが拡大した。さらに、この変異体を発現している細胞にハルミンを処理すると、野生型と比べ核小体内に Coilin が多く局在し

た。このことは、Y272C 変異体が SMN と Coilin の解離を阻害していることを示唆しており、SMN のカハール体からの放出における多量体化の重要な役割をさらに強調している。本研究より考えられるカハール体形成、SMN 分離における各ドメインの役割を Figure14 に示した。

以前の研究では、importin  $\beta$  と結合する能力を欠く E134K は核内インポートに欠陥があり、Y272C は importin  $\beta$  と結合する能力があるにもかかわらず、E134K 同様に核内インポートに欠陥があることが示された<sup>48</sup>。この知見は、SMN の多量体化がシャトリングにおいて複数の役割を担っていることを示唆しており、この変異体を引き起こす重篤な疾患を説明できる可能性がある。Y272C と同様に多量体化活性が低下した他の SMN 変異体を解析することで、このモデルをさらに裏付けることができるだろう。我々の研究では、これらの実験は内在性の野生型 SMN タンパク質の存在下で行われた。野生型タンパク質が存在しないと、SMN Y272C および E134K 変異体によって形成される凝集体が著しく変化する可能性がある。このような可能性を探り、われわれの知見が示すように、SMN のリサイクリングにおける多量体化の役割を確認するためには、更なる研究が必要である。

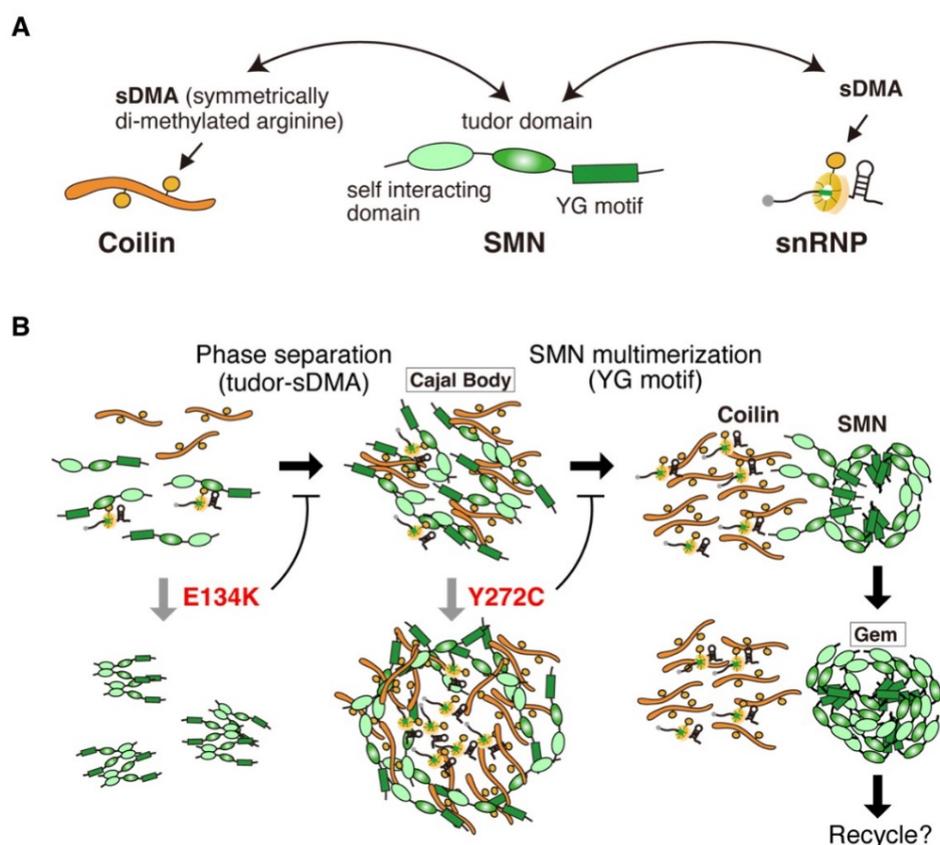


Figure 14

#### SMN 多量体化のカハール体形成におけるモデル

(A) カハール体形成に必須のタンパク質ドメインとモチーフ構造。SMN の tudor ドメインは、Coilin と Sm タンパク質の RG モチーフの対称的にジメチル化されたアルギニン (SDMA) と結合し、カハール体の形成を促進する。SMN の YG ドメインは SMN の多量体化に関与している。(B) 核内移行後、SMN は tudor ドメインにより Coilin と相互作用し、tudor ドメインを含む多価相互作用を通してカハール体を形成する。カハール体が拡大し、SMN の濃度が多量化の閾値に達すると、多量化した SMN 構造はカハール体から排出されるが、これは tudor ドメイン相互作用を破壊するコンフォメーション変化による可能性がある。多量化が阻害された Y272C 変異体は、Coilin から切り離されず、より大きく不規則な形の核小体が形成される。

## 第二章

### SMN 多量体化ドメインの修飾による構造体形成制御

## 結果

### 化合物 Dehydrocostus lactone (DCL) がカハール体を消失させる

スプリットルシフェラーゼアッセイシステムを利用した snRNP 検出系<sup>55</sup>を用いて富山大学和漢医薬学総合研究所が所有する生薬化合物ライブラリーで化合物スクリーニングを行ない、複数のスプリットルシフェラーゼ活性を低下させる化合物を得た (Figure 15A)。このヒット化合物がカハール体形成を変化させると考え、Coilin と SMN の局在を抗体染色で観察することでカハール体への影響を調べた。コントロールである DMSO 処理や Berberine、Cinobufagin 処理では Coilin、SMN の輝点つまりカハール体や Gem が見られるが、Dehydrocostus lactone (DCL) (Figure 15C) により Coilin、SMN どちらで観察してもカハール体、Gem は消失した (Figure 15B)。また、Coilin は分散後も核内に局在し、SMN は DCL 処理前と比べ核内に多く局在することが明らかになった (Figure 15B)。つまり DCL はカハール体だけでなく Gem も分散させ、分散させた後の SMN の核外輸送も阻害する。

また、カハール体は snRNP が集積する場所であるため、DCL によるカハール体の消失により snRNA の局在変化が起こることを予想し、snRNA の 1 つである U2 snRNA の局在を *in situ* hybridization により可視化した。DMSO 処理時では Coilin と共局在しカハール体に局在しているが、DCL 処理により核内で輝点を形成せずに U2 snRNA の集積が起こらなくなっていることが示された (Figure 15D)。

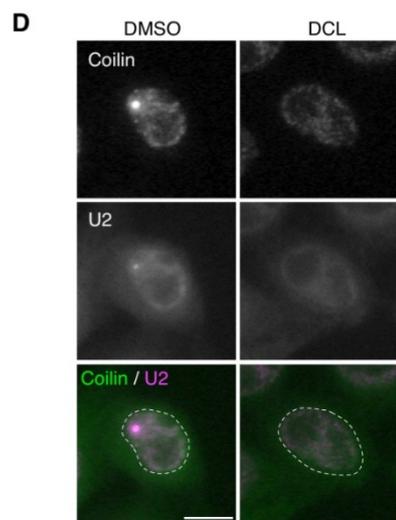
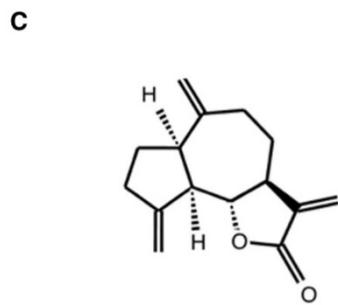
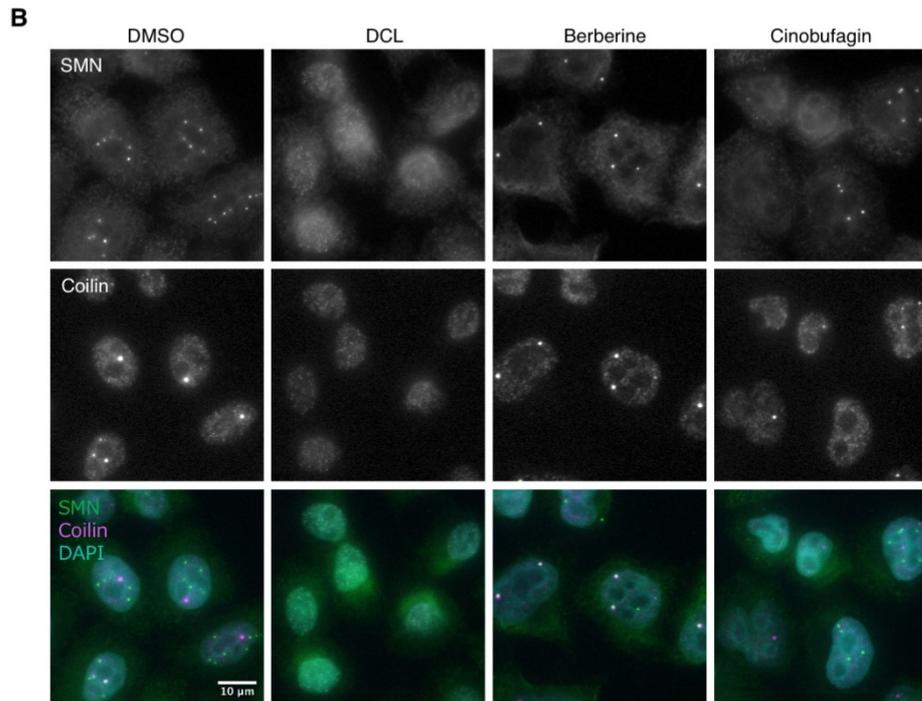
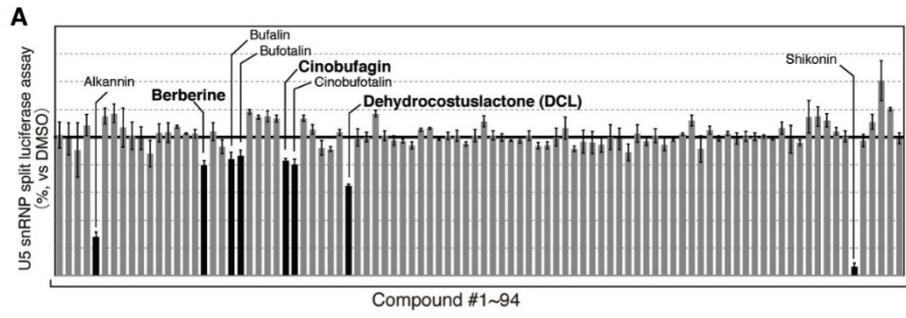


Figure 15.

### DCL 処理によりカハール体、Gem が消失し SMN が核内に蓄積する

(A) snRNP によるスクリーニング。生薬由来化合物をレポーター安定発現細胞株に 10  $\mu$ M で 4 時間処理した後の細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を検出した。(B) (A)のヒット化合物を処理した HeLa 細胞を固定し、抗 Coilin 抗体と抗 SMN 抗体で二重染色を行った。Dehydrocostus lactone (DCL) (20  $\mu$ M)により核内の輝点の消失と SMN の核内への蓄積が見られた。スケールバーは 10  $\mu$ m。(C) Dehydrocostus lactone (DCL) の構造式。(D) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M)で 4 時間処理した HeLa 細胞で U2 snRNA の局在を U2 snRNA プローブを用いた *in situ* hybridization により可視化し、抗 Coilin 抗体と二重染色を行った。白の破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

### DCL 類縁化合物においてカハール体、Gem が消失と SMN の SDS-PAGE の移動度の変化は相関がある

DCL の類縁化合物の構造活性相関を調べるために、DCL と同様にセスキテルペンラクトン類である Parthenolide、Costunolide、Santonin についても SMN と Coilin の局在観察、SMN のウェスタンブロットを行なった。その結果 DCL、Parthenolide、Costunolide 処理で Coilin、SMN どちらで観察してもカハール体、Gem は消失したのに対し、Santonin 処理では消失しないことが明らかになった (Figure 16A)。

これら DCL 類縁化合物の構造の特徴として DCL、Parthenolide、Costunolide は  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone 構造を持つのに対し、Santonin は持たないということがある (Figure 16B)。 $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone 構造はアミノ酸のシステイン残基やリシン残基にマイケル付加による共有結合を起こすことが知られており、DCL やその類縁化合物が何らかのタンパク質へ共有結合することでカハール体と Gem の消失を引き起こしていると予想された。

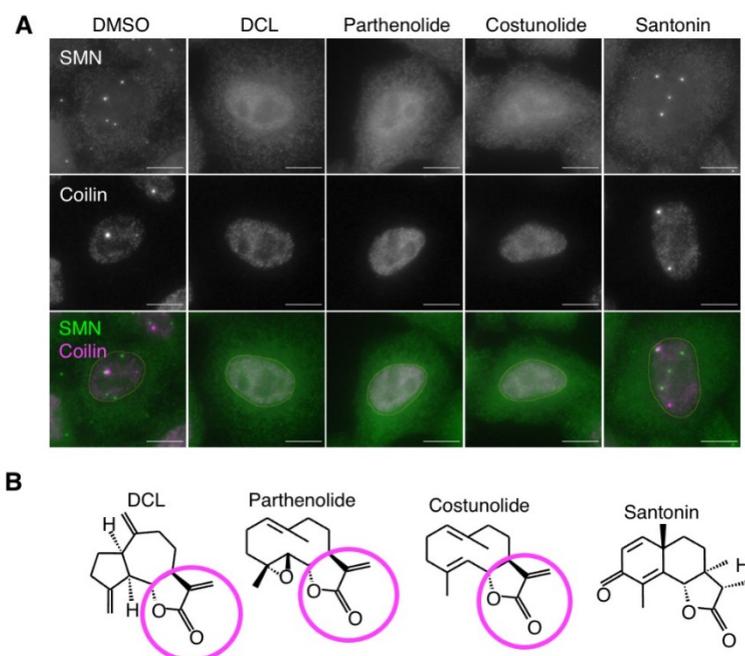


Figure .16

### DCL の構造活性相関

(A) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M)、Parthenolide (20  $\mu$ M)、Costunolide (20  $\mu$ M)、Santonin (20  $\mu$ M) で 4 時間処理した HeLa 細胞を抗 SMN 抗体および抗 coilin 抗体で二重染色を行なった。スケールバーは 10  $\mu$ m。核の輪郭を黄色の線で示した。(B) DCL、Parthenolide、Costunolide、Santonin の構造式。 $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone 構造をマゼンダの円で囲んだ。

### DCL は複数の作用点を持つ

DCL やその類縁化合物により Coilin と SMN の双方の局在が変化したことから、DCL の作用点が Coilin と SMN のどちらか一方にあるが相互作用の結果としてカハール体と Gem の双方が消失する、または Coilin と SMN の双方に作用するためカハール体と Gem が消失するという 2 つの機序が予想され、これを明らかにすることとした。メチル化酵素阻害剤である EPZ015666 は長時間作用させるとタンパク質のメチル化を減少させることから、カハール体形成に必要な Coilin の SDMA と SMN tudor ドメインの結合も減弱すると予想され、実際に Coilin と SMN の輝点は 48 時間処理で完全に分離することが知られている<sup>61</sup>。EPZ015666 を 48 時間処理し、Coilin と SMN の輝点を分離させた状態にして DCL 処理を行うことで Coilin と SMN の局在変化の分離ができると考え、局在を観察した。その結果、EPZ015666 処理によって分離した Coilin と SMN の輝点はどちらも DCL 処理により消失した (Figure17)。このことから、DCL は複数の作用点を持ち、Coilin、SMN 双方の局在に影響を及ぼすと考えられた。

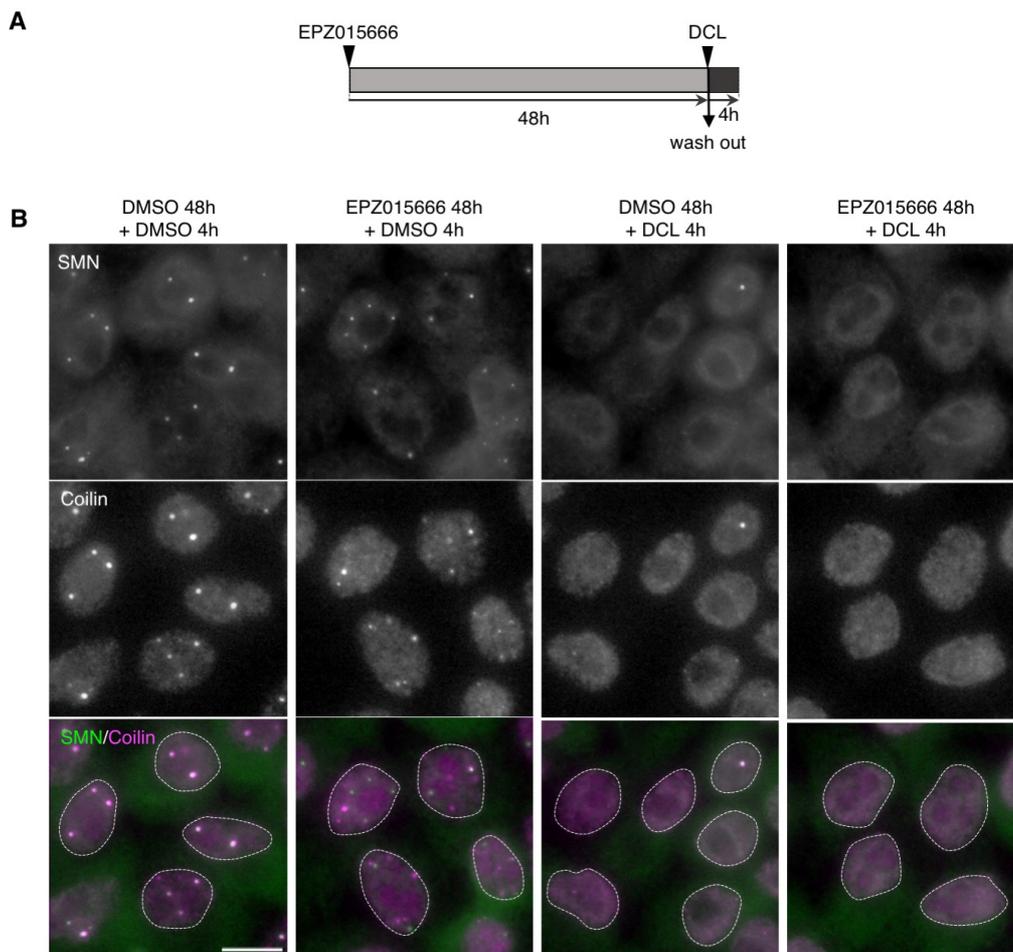


Figure 17

DCL は SMN と Coilin の輝点の双方を消失させる

(A)実験のタイムコース。HeLa 細胞に EPZ015666 (5  $\mu$ M) 処理を 48 時間行った後、培地を除去し培地交換で DMSO (0.2%) または DCL (20  $\mu$ M) を添加し 4 時間培養し、固定した。(B) A のように固定した後、SMN と Coilin で二重染色を行いカハール体/Gem を観察した。破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

## DCL 処理により SMN の SDS-PAGE の移動度の変化が起きる

DCL 処理によりカハール体や Gem が消失する機構の探索のために、DCL 処理後の HeLa 細胞抽出液を用いてウェスタンブロットを行ない、抗 Coilin 抗体、抗 SMN 抗体で検出した。その結果、DCL 処理により Coilin のバンドには変化は観察されなかったが、SMN については DMSO 処理時と SDS-PAGE の移動度が等しいバンドに加え、移動度の高い SMN のバンドが現れることが明らかになり、SMN に何らかの修飾などの影響を及ぼしていることが示された (Figure 18A)。

また、DCL の類縁化合物である Parthenolide、Costunolide、Santonin 処理後の HeLa 細胞抽出液でも同様にウェスタンブロットを行なった。その結果いずれの化合物でも Coilin のバンドには変化が観察されなかったが、SMN については DCL に加え Parthenolide、Costunolide 処理でも SDS-PAGE の移動度の高い SMN のバンドが現れることが明らかになった。また Santonin 処理ではこの SMN の SDS-PAGE の移動度の変化は観察されなかった (Figure 18B)。このウェスタンブロットの結果は Figure 16 の DCL の類縁化合物を用いた SMN と Coilin の局在変化と相関があり、両者に関係があることが示唆された。

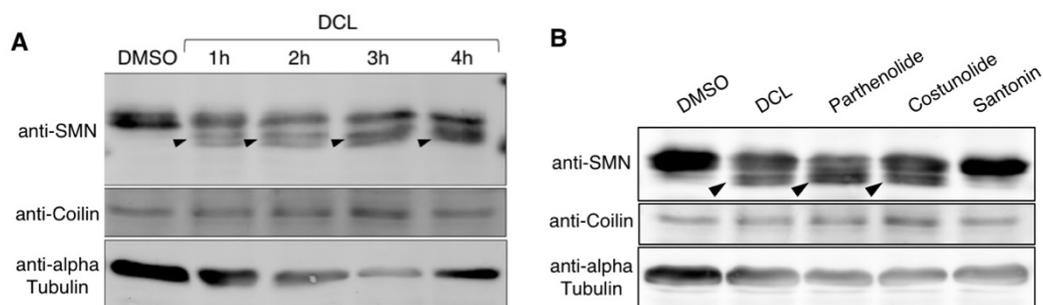


Figure 18

### DCL 処理により SMN の SDS-PAGE の移動度が変化する

(A) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M) で 1、2、3、4 時間処理した HeLa 細胞を回収し、抗 SMN 抗体および抗 coilin 抗体でウェスタンブロットを行った。DCL 処理により SMN では矢頭で示す移動度が高いバンドが検出された (上段)。Coilin のバンドには変化が見られなかった (中段)。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。(B) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M)、Parthenolide (20  $\mu$ M)、Costunolide (20  $\mu$ M)、Santonin (20  $\mu$ M) で 4 時間処理した HeLa 細胞を回収し、抗 SMN 抗体および抗 coilin 抗体についてウェスタンブロットを行なった。DCL、Parthenolide、Costunolide 処理により SMN では矢頭で示す移動度が高いバンドが検出された (上段)。Coilin のバンドには変化が見られなかった (中段)。Alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。



Figure 19

リン酸化、アルギニンのジメチル化、システインの酸化は DCL 処理により変化しない

(A) HeLa 細胞に SMN を FLAG tag との融合タンパク質として一過性に過剰発現させ、DMSO または DCL (20  $\mu$ M) 処理を 4 時間行った後に、FLAG tag で免疫沈降を行った。その後のライセートに対し CIAP 処理を行い、ウェスタンブロットを行い、抗 FLAG 抗体で検出した。(B) HeLa 細胞に DCL (20  $\mu$ M) 処理を 4 時間行った後、ライセートとし、PEG-PCMal によるラベルを行い、抗 SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。(C) HeLa 細胞に SMN を FLAG tag との融合タンパク質として一過性に過剰発現させ、DMSO または DCL (20  $\mu$ M) 処理を 4 時間行った後に、FLAG tag で免疫沈降を行った。ウェスタンブロットを行い、抗 FLAG 抗体、SDMA の認識抗体である抗 dimethyl-Arginine Antibody, symmetric (SYM10)、ADMA の認識抗体である抗 Asymmetric Di-Methyl Arginine Motif [adme-R]抗体で検出した。FLAG-SMN のバンドの位置に抗 SDMA 抗体および抗 ADMA 抗体ではバンドは検出されなかった。

そこで、SMN のバンドシフトの原因となるアミノ酸の特定のため、SMN の N 末端側 100 アミノ酸、C 末端側 100 アミノ酸、Exon3、Exon4 をそれぞれ欠失した SMN の欠失変異体に FLAG タグを付けたもの (FLAG-SMN- $\Delta$ N、FLAG-SMN- $\Delta$ C、FLAG-SMN- $\Delta$ E3、FLAG-SMN- $\Delta$ E4)を HeLa 細胞に過剰発現させ、ウェスタンブロットを行なった。その結果、Exon3 欠失変異体である FLAG-SMN- $\Delta$ E3 でのみ、DCL 処理による SMN の SDS-PAGE のバンドシフトが見られなくなり、SMN の Exon3 にコードされる領域に DCL 処理による SDS-PAGE の移動度の変化の原因となるアミノ酸が存在することが予想された (Figure 20A)。SMN の exon3 のアミノ酸配列は (Figure 20B) に示す。Exon3 は tudor ドメインであり、立体構造が調べられている<sup>78,29</sup>。既に DCL によりシステイン残基は酸化修飾を受けないことは確認したが、システイン残基は反応性が高く酸化以外の修飾が起こることが知られているため、システイン残基に着目した。SMN の exon3 のアミノ酸には 2 箇所のシステイン残基があり、これらは解析された SMN の tudor ドメインの立体構造の外に露出していることから (Figure 20C)、これらのシステイン残基が修飾されうると考えアミノ酸置換変異体を作成した。この変異体を HeLa 細胞に過剰発現し、DCL を作用させバンドシフトを観察したところ、C107A 変異体では FLAG-SMN のバンドシフトが見られるが、C146A 変異体ではバンドシフトが見られなくなった (Figure 20D)。つまり、DCL による SMN のバンドシフトは C146 に起こるシステイン残基の修飾が原因であることが示唆された。

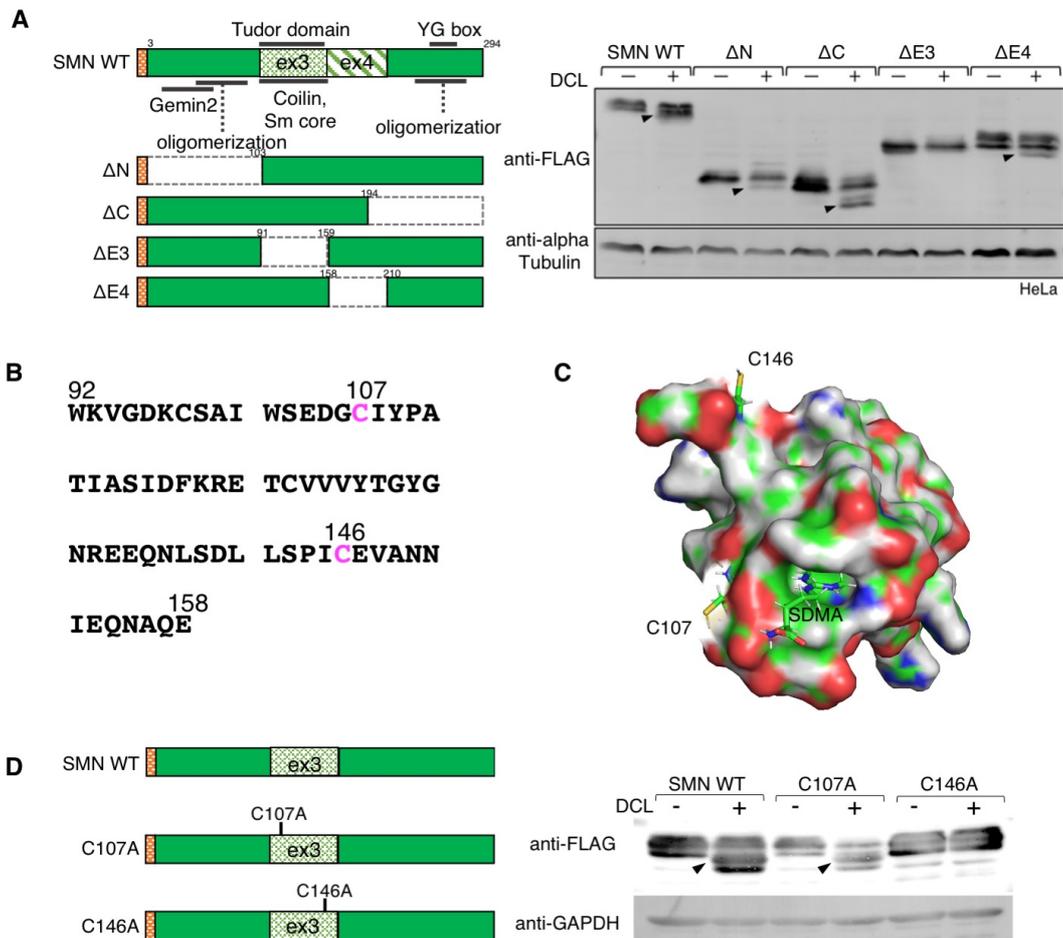


Figure 20

SMN の C146 が DCL によるバンドシフトの原因である

(A) SMN の欠失変異体を用いて DCL によるバンドシフトを引き起こす領域を特定した。(左)使用した SMN の欠失変異体の模式図。野生型 SMN (WT)、SMN の N 末端側 100 アミノ酸の欠失変異体 ( $\Delta$ N)、C 末端側 100 アミノ酸の欠失変異体 ( $\Delta$ C)、Exon3 欠失変異体 ( $\Delta$ E3)、Exon4 欠失変異体 ( $\Delta$ E4)を FLAG tag との融合タンパク質としてそれぞれ発現させた。(右) 欠失変異体を HeLa 細胞に発現させ、DCL 処理 (20  $\mu$ M、4 時間) を行った後の細胞抽出液を用いて、FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。矢頭は DCL によりシフトしたバンドを示す。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。(B) SMN の exon3 のアミノ酸配列。(C) 解析された SMN の 84 から 147 番目のアミノ酸までの立体構造<sup>29</sup>。Tudor ドメインに SDMA が相互作用している様子を示している。C146 と C107 と SDMA を図中に示した。(D) SMN の exon3 のシステイン残基のアミノ酸置換変異体を用いて DCL によるバンドシフトを引き起こす残基を特定した。(左)使用した SMN のアミノ酸置換変異体の模式図。SMN の 107 番目のシステイン残基をアラニンに置換した変異体 (C107A) と 146 番目のシステイン残基をアラニンに置換した変異体 (C146A)を FLAG tag との融合タンパク質としてそれぞれ発現させた。(右) アミノ酸置換変異体を HeLa 細胞に発現させ、DCL 処理 (20  $\mu$ M、4 時間) を行った後の細胞抽出液を用いて、FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。矢頭で化合物処理によってシフトしたバンドを示した。GAPDH をローディングコントロールとして用いた (下段)。

## エタクリン酸は DCL と類似の効果を示す

DCL がシステイン残基に修飾を起こすメカニズムを明らかにすることを目標としたが、DCL やその類縁化合物はマイケル付加により様々なタンパク質を標的として結合することが報告されており<sup>79</sup>、標的の探索は困難である。そこで、理化学研究所の二階堂愛博士、笹川洋平博士との共同研究により、標的が既知である北海道大学創薬研究開発センターの承認薬のライブラリーを用いてトランスクリプトーム解析、化合物のクラスタリングを行った。このクラスタリングの結果、Table7 の化合物が DCL と同一のトランスクリプトームに含まれた。Table7 の化合物のうちグルタチオン-S-トランスフェラーゼの阻害剤であるエタクリン酸、プリン核酸生合成阻害剤であるメルカプトプリン、抗菌薬である酢酸フェニル水銀、タンパク質合成阻害剤であるピューロマイシン、NF- $\kappa$ B 抑制剤である塩化サングイナリウムを用いて、DCL と同様にカハール体の消失とバンドシフトを引き起こす化合物があるかを調べた。その結果、エタクリン酸で特異的にカハール体と Gem の消失、SMN の核内への蓄積、SMN のバンドシフトという DCL と同様の効果を示した (Figure 21 A、B、データ未提示)。ただし、SMN のバンドシフトにおいては、DCL とシフト後のバンドの位置にわずかなずれが生じていることが示され、化合物によりシフトの幅は異なる可能性が示唆された。

Table7. DCL 類似化合物

承認薬
アセトヘキサミド
アブラマイシン硫酸塩
クロラザニル塩酸塩
エタクリン酸
イブプロフェン
メルカプトプリン
ニフルソル
酢酸フェニル水銀
ピューロマイシン二塩酸塩
塩化サングイナリウム
スペピロン
チメロサル

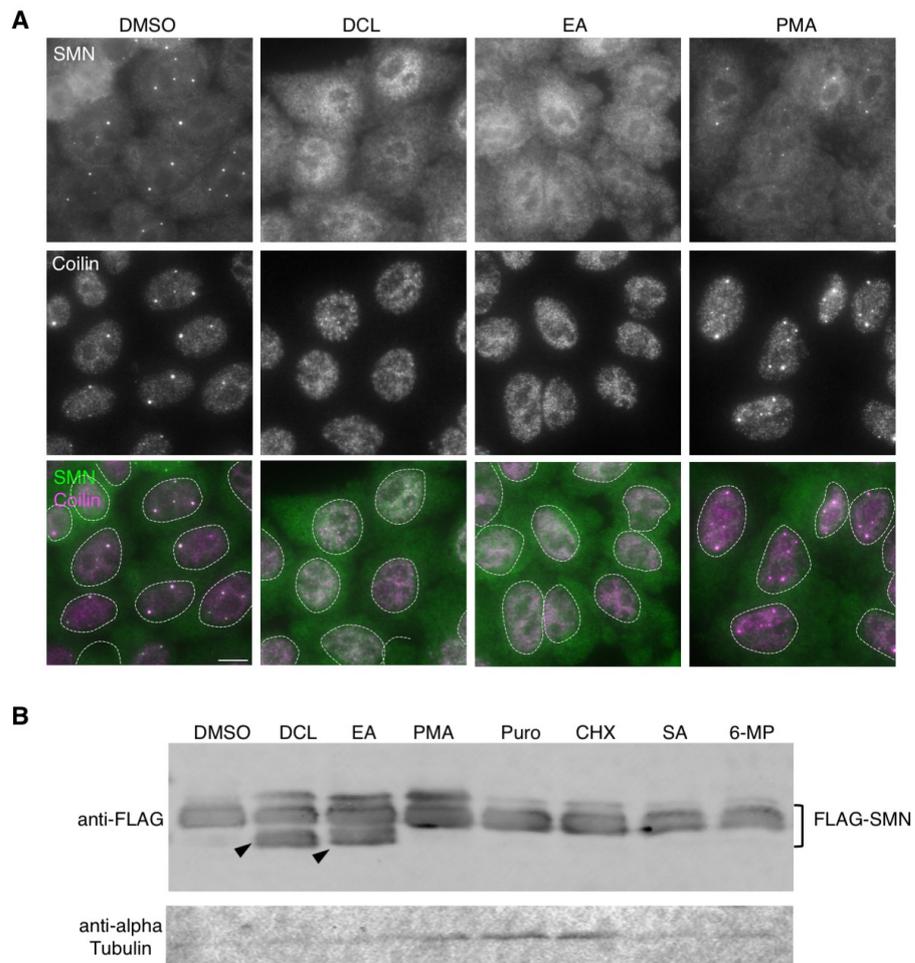


Figure 21

エタクリン酸によりカハール体と Gem が消失し、SMN のバンドシフトが起こる

(A) HeLa 細胞に DMSO、DCL、エタクリン酸 (EA)、酢酸フェニル水銀 (PMA) 処理を 4 時間行い固定した後、抗 SMN 抗体と抗 Coilin 抗体で二重染色を行いカハール体と Gem を観察した。破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B) FLAG-SMN を一過的に過剰発現させた HeLa 細胞に DMSO、DCL、EA、PMA、ピューロマイシン二塩酸塩 (Puro)、シクロヘキサミド (CHX)、塩化サングイナリウム (SA)、メルカプトプリン (6-MP) 処理を 4 時間行った後の細胞抽出液を用いて FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。矢頭で化合物処理によってシフトしたバンドを示した。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。

## 脂質過酸化の産物は SMN のバンドシフトとカハール体消失を引き起こす

エタクリン酸はグルタチオンに付加されてグルタチオン-S-トランスフェラーゼと結合して、その活性を阻害することで細胞内のグルタチオン濃度を低下させ、グルタチオンによる酸化還元状態の維持に負の影響を与えることが知られている<sup>80</sup>。一方、DCL を処理した細胞でもグルタチオン濃度が低下することが報告されている<sup>81</sup>。そこで、DCL によるカハール体消失や SMN のバンドシフトが引き起こされる機序は、グルタチオンによる細胞内の酸化還元状態の恒常性低下と予想した。

細胞内でグルタチオンは活性酸素の消去、無毒化を行なっている。細胞内の活性酸素は好氣的代謝の副産物として生じる<sup>82,83,84</sup>。その原因はミトコンドリア呼吸鎖からの電子の漏出であり、呼吸鎖で酸素分子の還元が不完全になるとスーパーオキシドラジカルアニオン ( $O_2\cdot^-$ ) と過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が生成する。加齢とともにこの活性酸素は増加することが知られ、老化の主な原因と考えられている<sup>85,83,86</sup>。発生した  $O_2\cdot^-$  や  $H_2O_2$  はさらに、 $O_2\cdot^-$  ではペルオキシ亜硝酸塩 ( $ONOO^-$ )、過酸化水素はヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) という反応性の高い酸化剤になる<sup>87,88</sup>。これらはタンパク質、脂質、DNA に損傷を与える。タンパク質では立体構造の変化、DNA では変異が起こり、脂質では不飽和の脂肪酸の過酸化が起こる。脂質の過酸化で最終産物として反応性アルデヒドが発生することが知られ、それらのうち主なものは  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ヒドロキシアルケナール 4-Hydroxynonenal (4-HNE)<sup>89</sup> であり、n6-脂肪酸から産生される。反応性アルデヒドはタンパク質に結合することが知られており<sup>90</sup>、4-HNE はタンパク質のシステイン、リジン、ヒスチジン残基に共有結合した付加物を生成すること、4-HNE はアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)<sup>91,92</sup>、パーキンソン病などの患者での増加が報告されていることから<sup>93</sup>、これらの疾患の発症機序とタンパク質の 4-HNE 修飾の関係性が注目されている。

ここで 4-HNE の産生過程の例としてリノール酸から 4-HNE の産生過程<sup>94</sup> を Figure 22A に示す。まずヒドロキシラジカルにより脂質がラジカルになる。ここに酸素が加わることによりペルオキシラジカルが生成する。その後ペルオキシ環化が起こり、ジオキセタン開裂により断片化したオキシアルケニルラジカルが生じる。その後、4-HNE が生成される<sup>94</sup>。

反応性アルデヒドの発生原因となる活性酸素は通常グルタチオンにより抱合され無毒化されるが、エタクリン酸や DCL によりグルタチオン濃度が低下することで細胞内の活性酸素が増加することが予想される。その結果として反応性アルデヒドが増加し、増加した反応性アルデヒドが SMN を修飾してバンドシフトやカハール体の分散を起こすと考えた。そこで先に述べた 4-HNE と、求電子剤であるフマル酸ジメチル (DMF) を HeLa 細胞に作用させ、ウェスタンブロットを行い SMN のバンドシフトの有無を検出した。フマル酸ジメチルは細胞内の酸化還元状態を変化させ、酸化還元状態のセンサー

として機能する Nrf2 経路を活性化する化合物として知られている。また、多発性硬化症や乾癬などの自己免疫状態の治療にも用いられている薬剤である。

4-HNE、DMF のどちらを処理した細胞でも、SMN がバンドシフトを起こすことが明らかになり (Figure 22B)、SMN は 4-HNE と DMF により修飾されることが示唆された。そこで 4-HNE 処理後にカハール体の局在を観察したところ DCL より作用は弱い、カハール体と Gem の消失と核内への SMN の蓄積が観察された (Figure 22C)。一方 DMF では SMN の核内への蓄積は観察され、SMN の輝点の減弱や Coilin が核小体に蓄積する傾向が見られたが、カハール体消失の効果は 4-HNE と比較すると弱いものであった (Figure 22C)。

また、SMN に 4-HNE が直接結合しているかを明らかにするために *in vitro* で発現、精製した SMN の exon3 に 4-HNE 処理をし、SDS-PAGE、CBB 染色を行いバンドの観察を行った。その結果、野生型の exon3 と C107A の exon3 では 4-HNE 処理によりバンドシフトが観察された。さらに、C146A ではこのバンドシフトが観察されなかったことから SMN の C146 に直接 4-HNE が結合していると考えられた (Figure 22D)。一方、DCL も直接 SMN の C146 に結合する可能性が考えられたため、同様に精製した SMN の exon3 を DCL で処理して SDS-PAGE、CBB 染色を行った (Figure 22E)。しかし、バンドシフトは観察されず DCL が SMN を直接修飾する可能性は低いことが示された。更に SMN の直接的な酸化やグルタチオン化の可能性も考え、過酸化水素、酸化型グルタチオンで精製 SMN を処理し、同様に CBB 染色を行ったがバンドシフトは観察されなかった (Figure 22E)。

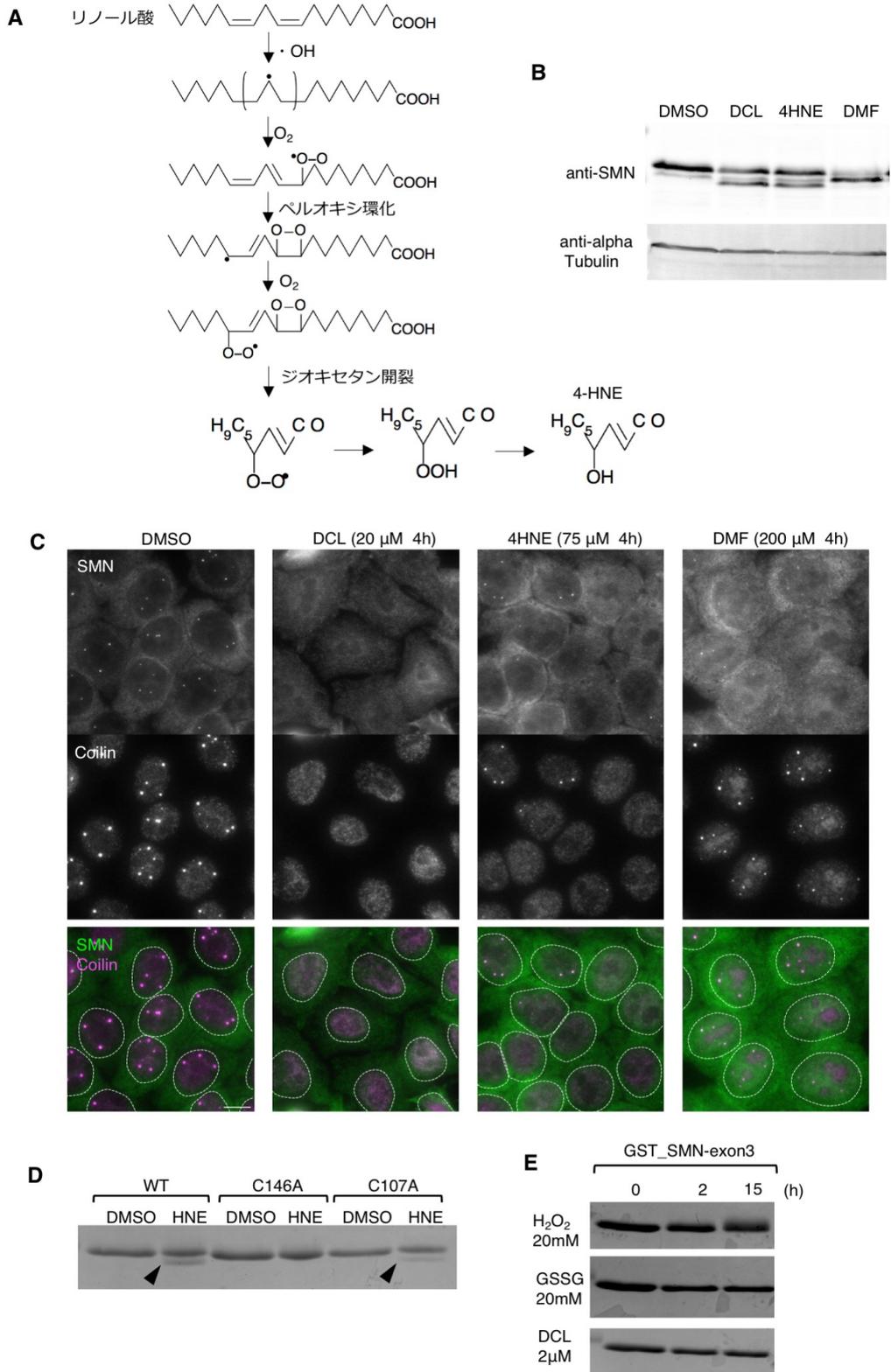


Figure 22

#### 4-Hydroxynonenal 処理によりカハール体と Gem の消失、バンドシフトが起こる

(A) リノール酸から 4-HNE が生成するまでの脂質過酸化<sup>94</sup> (B) HeLa 細胞を DMSO、DCL (20  $\mu$ M)、反応性アルデヒドである 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (60  $\mu$ M) とフマル酸ジメチル(DMF) (200  $\mu$ M)で 4 時間処理した後の細胞抽出液を用いて抗 SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。(C) HeLa 細胞を DMSO、DCL (20  $\mu$ M)、反応性アルデヒドである 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (60  $\mu$ M) とフマル酸ジメチル(DMF) (200  $\mu$ M)で 4 時間処理した後、固定し、抗 SMN 抗体と抗 Coilin 抗体で二重染色を行いカハール体と Gem を観察した。破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。(D) in vitro で SMN 野生型 (WT)、C146A、C107A の exon3 領域を GST 融合タンパク質として発現、精製した。これに 4-HNE を添加し 2 時間後に 2 $\times$  SDS サンプルバッファー、2 メルカプトエタノール (10%) を加え、加熱後 SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。矢頭でシフトしたバンドを示した。(E) in vitro で野生型の SMN の exon3 領域を GST 融合タンパク質として発現、精製した。これに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、GSSG、DCL を添加し、2 時間後、15 時間後に 2 $\times$  SDS サンプルバッファー、2-メルカプトエタノール (10%) を加え、加熱後 SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った。

#### SMN C146A 変異体でも 4-HNE 修飾が起こる

次に SMN のバンドシフトが 4-HNE 修飾によるか確認を行った。HeLa 細胞に FLAG-SMN の野生型 (WT)、C146A 変異体を発現させ 4-HNE 処理後に FLAG-tag で免疫沈降を行い、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行い抗 4-HNE 抗体で検出した (Figure 23A)。その結果、SMN WT では 4-HNE 処理により生じた 2 本のバンドのうち、低分子側にシフトしたバンドは抗 4-HNE 抗体で強く検出された。また、未処理と同じ位置にも抗 4-HNE 抗体でシグナル自体は弱いもののバンドが検出された。SMN-C146A 変異体では前述の通り、4-HNE 処理によるバンドシフトは見られなくなったが、未処理で観察される SMN と同じ位置に抗 4-HNE 抗体でバンドが強く検出された。したがって C146 が優先的に 4-HNE で修飾される部位ではあるが、C146 以外にも 4-HNE による修飾部位があり、他の部位の修飾は SDS-PAGE のバンドシフトは引き起こさないことが示唆された。

また DCL 処理時に抗 4-HNE 抗体で SMN のバンドが検出されるかを同様に検討したが (Figure 23B)、DCL 処理により出現したシフトバンドは抗 4-HNE 抗体では検出されなかった。つまり、DCL により C146 が修飾されるものの、主な修飾分子は 4-HNE ではないことが明らかとなった。これは、DCL により酸化還元状態が変化して産生される反応性アルデヒドは 1 種類の分子種だけでないため、4-HNE による修飾が抗体によって検出されるレベルに至っていないと考えている。

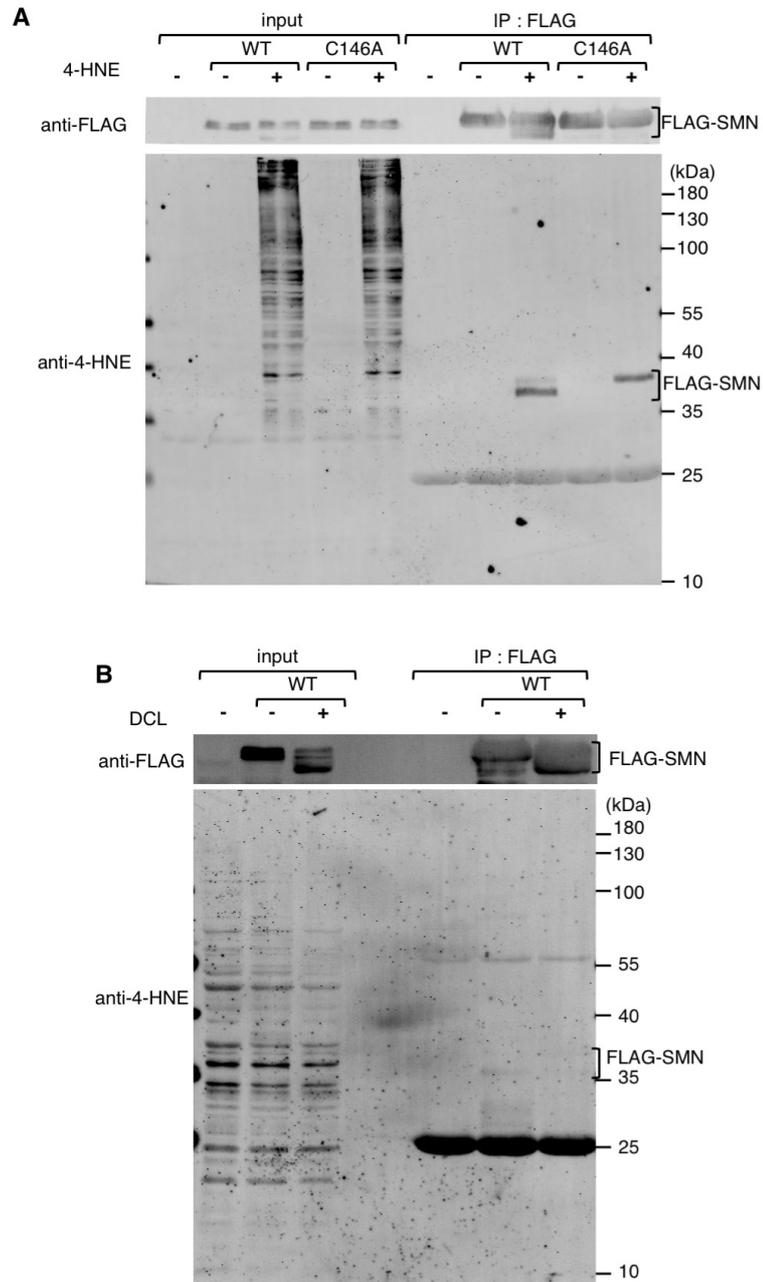


Figure 23

SMN、SMN C146A 変異体は 4-HNE 修飾が起こる

(A) HeLa 細胞に野生型 SMN (WT)と C146A 変異体を FLAG tag との融合タンパク質として一過性に過剰発現させ、DMSO または 4-HNE (60  $\mu$ M) 処理を 6 時間行った後に、FLAG tag で免疫沈降を行った。ウェスタンブロットを行い、抗 FLAG 抗体、抗 4-HNE 抗体で検出した。(B) HeLa 細胞に野生型 SMN (WT)を FLAG tag との融合タンパク質として一過性に過剰発現させ、DMSO または DCL (20  $\mu$ M) 処理を 6 時間行った後に、FLAG tag で免疫沈降を行った。ウェスタンブロットを行い、抗 FLAG 抗体、抗 4-HNE 抗体で検出した。FLAG-SMN のバンドの位置に抗 4-HNE 抗体でバンドは検出されなかった。

### C 末端システインの置換変異体はカハール体消失を抑制する

Figure 23A より C146 以外のシステインにも修飾が起こるが C146 に強く 4-HNE 修飾が起こることが示唆されたため、C146A 変異体について DCL 処理後にカハール体の局在を観察した。その結果、過剰発現の条件であるため野生型でも完全にはカハール体が消失せず輝点が細くなる変化であるが、C146A 変異体でも野生型の SMN と同様にカハール体が細くなること明らかにになった (Figure 24)。よって、C146 の修飾はカハール体の局在には影響を及ぼさないことが明らかになった。

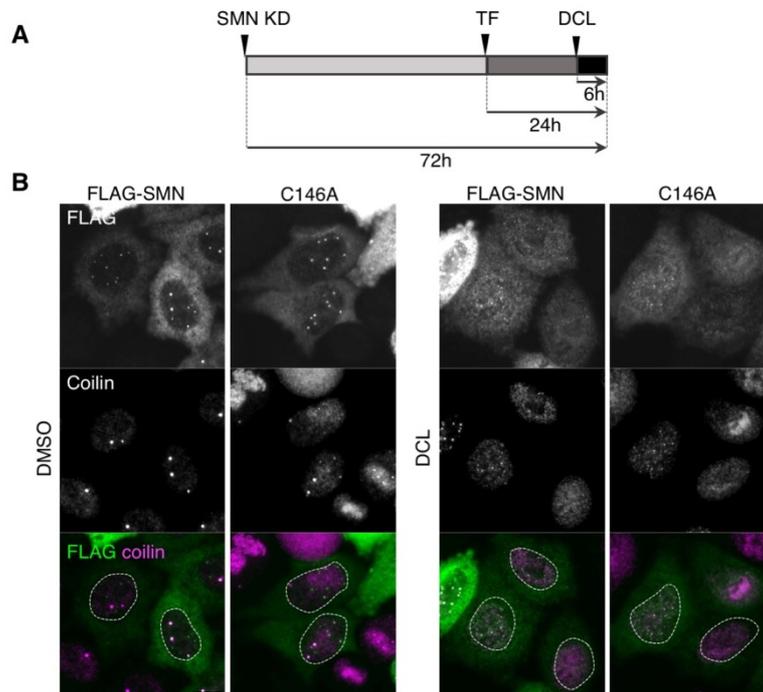


Figure 24

#### C146A 変異体は DCL より分散する

(A) 実験の模式図。HeLa 細胞の SMN を siRNA によりノックダウンし、siRNA に耐性の FLAG-SMN WT または FLAG-SMN Y272C を一過性に過剰発現し、DCL 処理を 6 時間行い、固定した。(B) A の模式図のように固定した HeLa 細胞を抗 FLAG 抗体で染色し、発現させた SMN を可視化した。スケールバーは 10  $\mu$ m。破線で核の輪郭を示した。

Figure 23A と Figure 24 の結果より C146 以外のシステインに 4-HNE 修飾が起こり、そのシステインの修飾がカハール体形成には影響していると仮説を立て、SMN のほかのシステイン残基のアミノ酸置換変異体を複数作成し、DCL 処理後に SMN の局在を観察した (Figure 25)。作成した変異体のうち、全てのシステインをアラニンに置換した変異体 8CA では SMN の細胞質局在が多く、カハール体がほぼ形成されなかった (データ未提示)。SMN の tudor ドメインの構造内部に位置する C98 と C114 を除いた全てのシステイン残基を置換した変異体 6CA では、全てのシステイン残基の置換変異体よりは改善されるものの細胞質局在が多く、カハール体形成は減弱した (Figure 25B)。そこで、N 末端側から C98 と C114 を除いたシステイン 3 つである C60、C107、C146 のアラニンへの置換変異体 N-3CA と残りの C 末端側の 3 つのシステイン残基である C231、C250、C289 のアラニンへの置換変異体 C-3CA の二つの変異体を作成し SMN の局在を観察した。その結果、N-3CA では DCL 処理によりカハール体が分散するが、C-3CA では分散が抑制されることが明らかになった (Figure 25C)。この染色画像の核内の抗 FLAG 抗体の染色の輝度を測定し、カハール体を含まない核質の輝度を全核質の輝度で割ることにより SMN の核質分散比として定量した (Figure 25D)。その結果、C-3CA では SMN WT と比べ DCL 処理後の SMN の核質への分散が抑制されており、カハール体が維持されていることが示された。

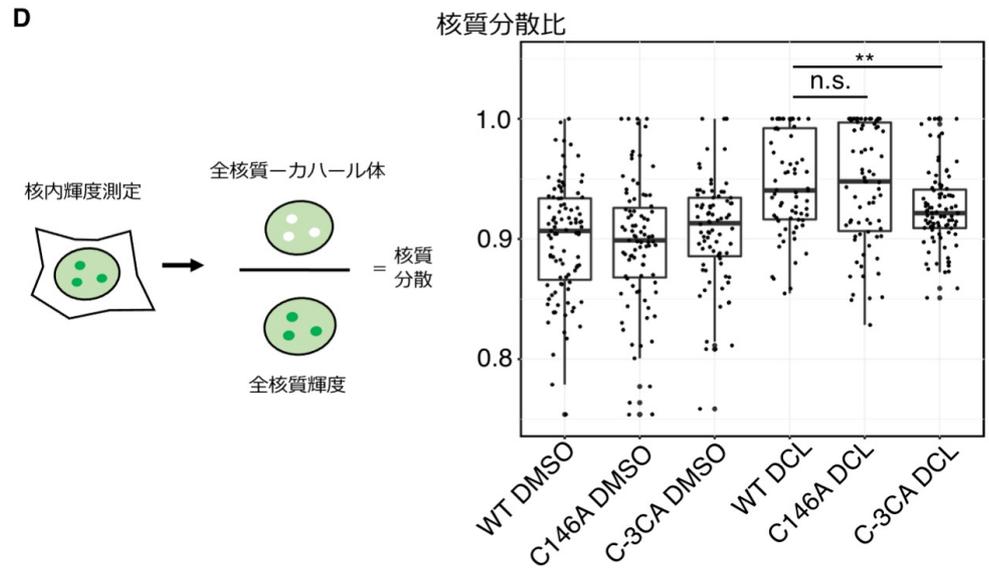
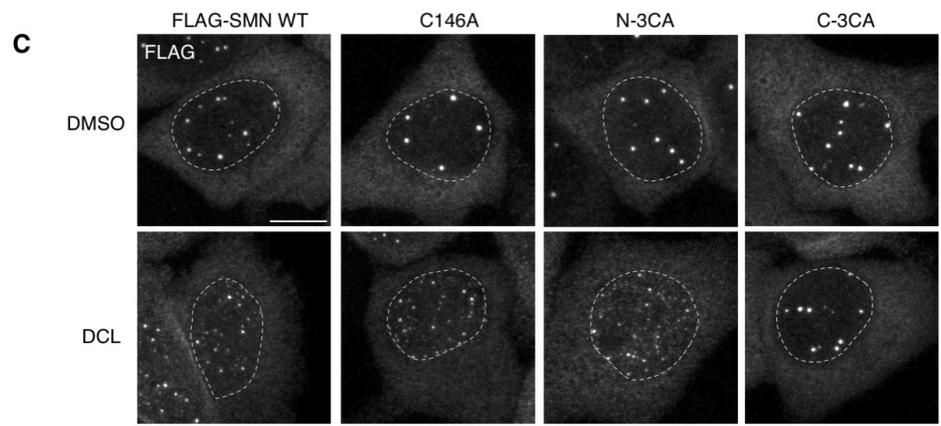
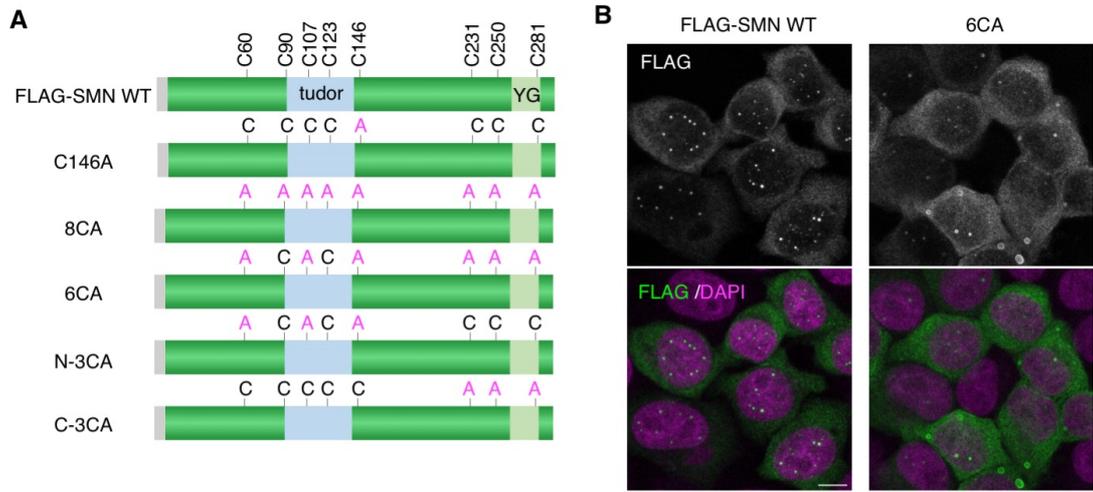


Figure 25

C 末端側のシステイン残基の置換変異体では DCL によるカハール体分散が抑制される

(A) 使用した SMN のシステイン残基置換変異体の模式図。(B) snRNA に耐性な FLAG SMN WT と 6CA 変異体を内在の SMN を siRNA でノックダウン後 48 時間後にトランスフェクションして HeLa 細胞に発現させ、トランスフェクションから 24 時間後に固定し、抗 FLAG 抗体で染色することで発現させた SMN の局在を共焦点顕微鏡で観察し Z スタックから作成した直交投影画像を取得した。6CA 変異体で WT と比べ核内の SMN の輝点の形成が少なかった。スケールバーは 10  $\mu$ m。(C) (D) Figure 24A の実験系の模式図と同様のタイムコースで実験を行った。(C) FLAG SMN WT と C146A、N-3CA、C-3CA 変異体を HeLa 細胞に発現させ DCL 処理の後、固定し、抗 FLAG 抗体で染色することで発現させた SMN の局在を共焦点顕微鏡で観察し Z スタックから作成した直交投影画像を取得した。C-3CA 変異体では DCL 処理後の SMN の分散が抑制された。破線は核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。(D) C の画像から分散の程度を定量した。定量は Cell profiler、グラフ化と有意差検定は R を用いて行った。DAPI の染色画像より核の位置を指定し、その範囲の抗 FLAG 抗体の染色の輝度を測定することで核内の全核質輝度を測定した。抗 FLAG 抗体の染色画像から明瞭な輝点をカハール体として設定し、これを含まない核質の輝度を測定した。この値を全核質の輝度で割ることにより SMN の核質分散比を算出した。有意差検定はウィルコクソンの順位和検定で行い p 値は 0.0011 (\*\*と表記)。

また、これらの置換変異体について DCL 処理後にウェスタンブロットを行った。その結果いずれの変異体でも発現量に変化は見られないが、C146 の置換を含む変異体 (6CA、N-3CA) では、DCL 処理によりバンドシフトが見られず、C146 の置換を含む変異体 (C-3CA) では、DCL 処理によりバンドシフトが見られた (Figure 26)。このことから、SMN のシステイン残基の内、修飾によりバンドシフトを引き起こすシステイン残基は C146 のみであることが示された。

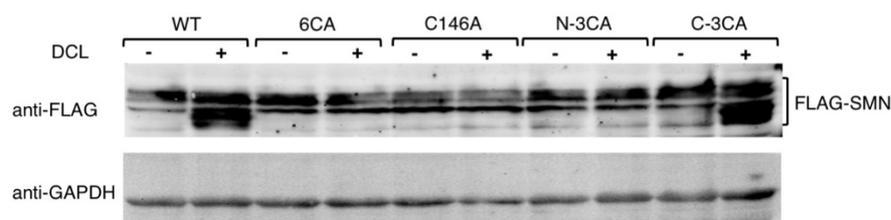


Figure 26

各システイン残基の置換変異体でのウェスタンブロット

FLAG-SMN WT、6CA、N-3CA、C-3CA を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞に DCL 処理を行い、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

C-3CA で置換した 3 つのシステイン残基のうち、よりカハール体形成に影響を及ぼすシステイン残基を特定するために、それぞれの置換変異体 C231A、C250A、C289A を作成した。これらの置換変異体を HeLa 細胞で内在の SMN をノックダウンした条件下で発現させ DCL 処理後の局在を観察したところ、C231A 変異体では DCL によるカハール体の分散を抑制しなかったが、C250A と C289A では同程度のカハール体分散の抑制を示した (Figure 27A、B)。そこで C250 と C289 のダブルミュータント C250A / C289A を作成し、DCL 処理後の局在を観察を行ったところ、単一の変異体よりも強いカハール体分散の抑制効果を示し、C250 と C289 がカハール体形成に役割を果たしていることが示唆された (Figure 27A、B)。この C250 と C289 の 2 つのシステイン残基は多量体化ドメインである YG ボックスの周辺に位置している。したがって、YG ボックス周辺のアミノ酸残基に修飾が起こることにより、多量体形成が損なわれて SMN の輝点が分散された可能性が示唆された。

さらに、C146A/C250A/C289A 変異体も作成し影響を及ぼさないかを観察したが、C250A/C289A と変化は見られず、C146 は修飾を受け SMN の SDS-PAGE のバンドシフトを引き起こすものの、局在には影響しないことが再度確認された (Figure 27A,C)。

これら変異体で Figure 23A と同様に SMN に 4-HNE 修飾が起こるかを検出した (Figure 28)。その結果、SMN 6CA 変異体では 4-HNE 修飾のバンドが検出されず、SMN ではシステイン残基以外の修飾はほぼ起きていないことが示された (Figure 28A)。C-3CA でもシフト前の位置のバンドが抗 4-HNE 抗体で検出されるが、WT よりもバンドが薄く、C146 以外の修飾の大半は C-3CA で置換した 3 箇所のシステインであることが示された。更に、C146A/C250A/C289A 変異体では、バンドシフトが観察されなくなり、シフト前の位置のバンドも C-3CA 変異体同様にシグナルは弱くなっており、C146、C250、C289 が SMN の 4-HNE による主要な修飾部位であると示唆された (Figure 28B)。

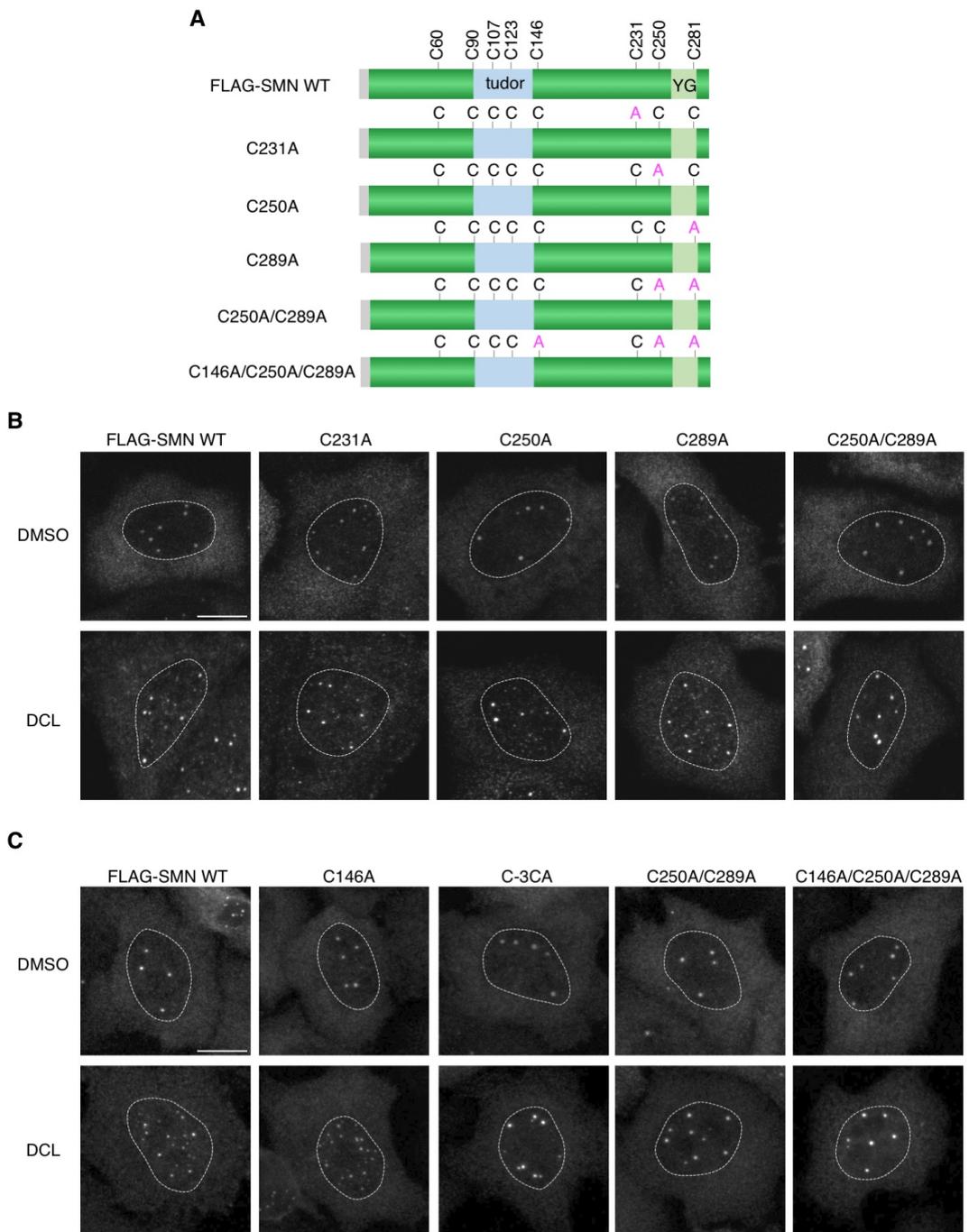


Figure 27

SMN C250、C289 の置換変異体でカハール体の分散が抑制される

(A) 使用した SMN のシステイン残基置換変異体の模式図。(B) 内在の SMN をノックダウン後 FLAG SMN WT と C-3CA、C231A、C250A、C289A 変異体を HeLa 細胞に発現させ DCL 処理の後、固定し、抗 FLAG 抗体で染色することで発現させた SMN の局在を観察した。破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。(C) FLAG SMN WT と C-3CA、C250A/C289A、C146A/C250A/C289A 変異体を HeLa 細胞に発現させ DCL 処理の後、固定し、抗 FLAG 抗体で染色することで発現させた SMN の局在を観察した。破線で核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

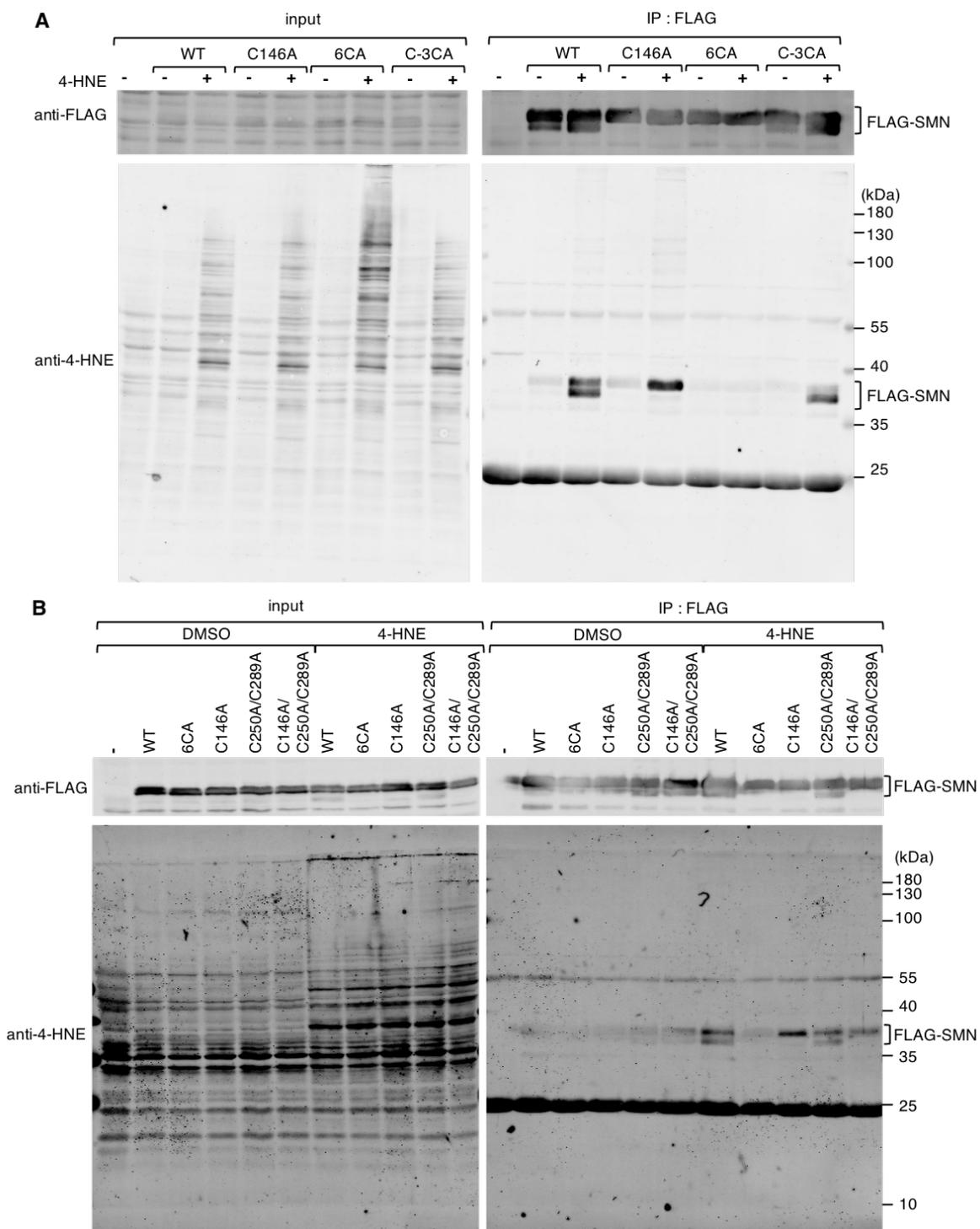


Figure 28

各システイン残基の置換変異体での抗 4-HNE 抗体でのウェスタンブロット

(A) FLAG-SMN WT、C146A、6CA、C-3CA を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞に 4-HNE 処理を行い、FLAG tag で免疫沈降を行い、抗 4-HNE 抗体と抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。(B) FLAG-SMN WT、C146A、8CA、C250A/C289A、C146A/C250A/C289A を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞に 4-HNE 処理を行い、FLAG tag で免疫沈降を行い、抗 4-HNE 抗体と抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。

## 超解像顕微鏡による DCL 処理時のカハール体の観察

第1章で、ハルミン処理からのカハール体再形成過程での超解像顕微鏡による観察 (Figure8) と SMN Y272C 変異体を用いた超解像顕微鏡での観察 (Figure12) を行った。その結果より、カハール体は形成初期からの時間経過により分子数が増大する中で SMN の多量体形成が起こり、SMN がリング状に観察される形状へと変化し、SMN がカハール体から離れていることが示唆された。DCL により、SMN のリング状に観察される形状がどのように変化するか、また回復は見られるのか検討を行った。

## DCL 処理時におけるカハール体の微細構造の変化

DCL 処理によるカハール体の消失がどのように起こっているかを調べるため、HeLa 細胞に DCL 処理の時間を1時間おきに1~4時間行ない、SMN、Coilin の局在を観察した。DCL 処理からの時間ごとに蛍光顕微鏡でその局在を観察したところ、時間が経つほどカハール体を形成する細胞が少なくなった (Figure 29A)。また、DCL 処理後に残った輝点は SMN と Coilin が共局在しているものが DCL 処理前よりも増加していることが明らかになった。

これらのカハール体を超解像顕微鏡を用いて微細構造を観察した結果、DCL 処理時間に従ってカハール体を構成する SMN、Coilin の大きさが小さくなることが明らかになった (Figure 29B)。また、2重のリング状の構造がなくなり、DCL 処理4時間後に残った輝点は小さく Coilin や SMN が混ざった構造であり、化合物処理前のカハール体とは微細構造が異なることが明らかになった (Figure 29B)。

DCL 処理により、U2 snRNA の局在は核内で輝点を形成しないことが Figure 1 で示された。Figure 29A、B と同様に DCL 処理の時間を1時間おきに1~4時間行ない、Coilin と U2 snRNA の局在を *in situ* hybridization により可視化し、超解像顕微鏡を用いて観察した。その結果 DCL 処理により、Coilin と共局在する U2 snRNA は減少し4時間後に残存する Coilin の輝点には U2 snRNA の明確な凝集は観察されなくなった (Figure 29C)。このことから、DCL 処理後に残った Coilin の輝点は snRNA を集めることが出来ないことが示唆された。

これらのことから、DCL 処理により SMN と Coilin、snRNA の分離構造が形成されなくなり、カハール体が消失していくことが示唆された。

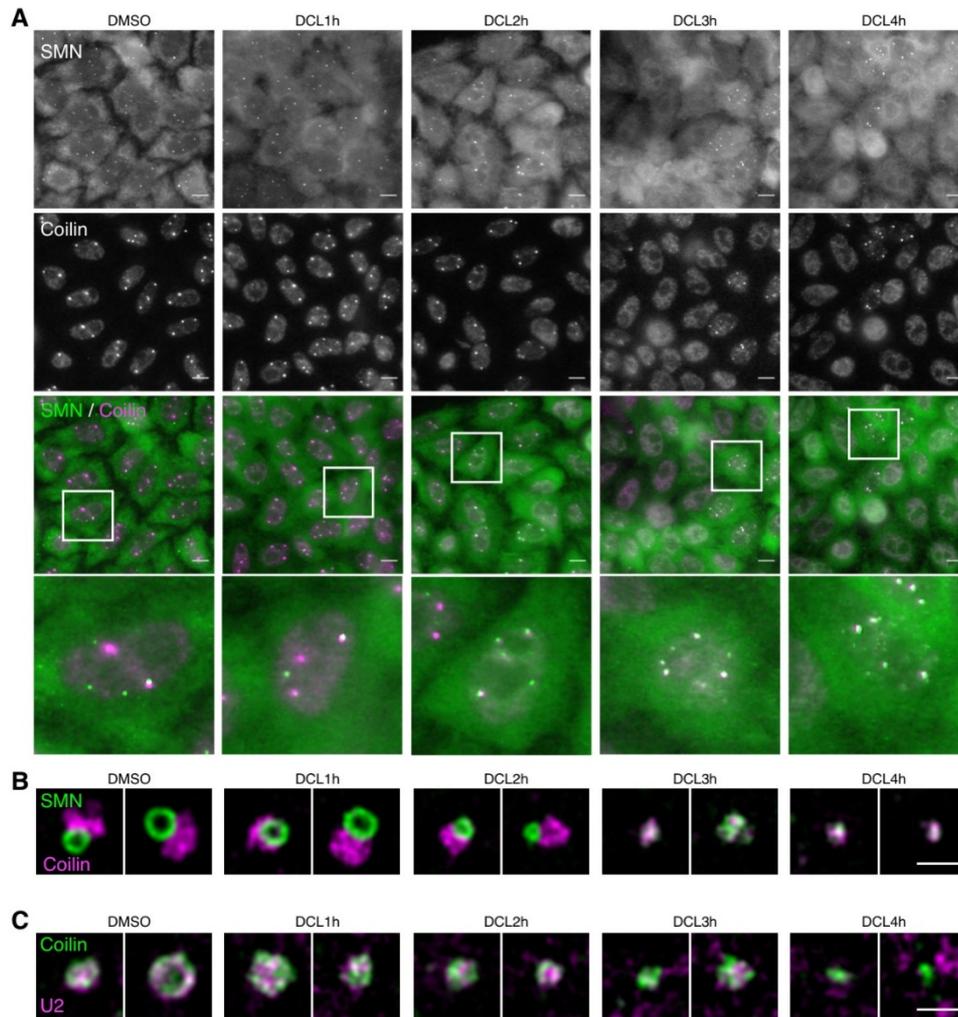


Figure 29

#### DCL 処理時のカハール体の局在変化

(A) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M) で 1、2、3、4 時間処理した HeLa 細胞を抗 SMN 抗体および抗 coilin 抗体で二重染色を行なった。スケールバーは 10  $\mu$ m。白枠の拡大図を下図に示した。(B) (A)の核内の Coilin と SMN が共局在する輝点を超解像顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 1  $\mu$ m。(C) DMSO (0.2%)、DCL (20  $\mu$ M) で 1、2、3、4 時間処理した HeLa 細胞で U2 snRNA について *in situ* hybridization を 行い、Coilin と二重染色し、Coilin の輝点を超解像顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 1  $\mu$ m。

## DCL 処理からのカハール体回復過程での微細構造の回復

DCL 処理によりカハール体が消失した後、DCL を除去し培養を続けることでカハール体が回復するかどうかを検出した (Figure 30A)。HeLa 細胞でカハール体を DCL 処理からの時間ごとに蛍光顕微鏡でその局在を観察したところ、DCL 除去から 9 時間の時点ではカハール体を形成している細胞は少なく、形成されているカハール体自体は小さく、細胞あたりの数も多いことが明らかになった (Figure 30B)。そして DCL 除去から時間が経つにつれ次第にカハール体が大きくなり、数も少なくなることが明らかになった (Figure 30B)。このカハール体を超解像顕微鏡により観察することでカハール体の形成の微細構造を観察した。その結果、DCL 除去から 12 時間の時点では小さく Coilin や SMN が混ざった構造であることが明らかになった。そして DCL 除去から時間が経つにつれ、SMN のリング状の構造とそれを取り巻く Coilin が 2 重に別れて観察されるようになった (Figure 30C)。このことから、SMN と Coilin によるカハール体の形成過程は SMN と Coilin が集合して小さな輝点を形成し、そこに SMN と Coilin がさらに集まり SMN を内側に 2 重のリング状の構造を形成する。その後、SMN と Coilin が離れ別の構造体を形成すると予想された。この結果は第 1 章のハルミン処理後の回復培養におけるカハール体再形成の過程の超解像顕微鏡を用いた観察結果と一致していた。

また、この回復時の細胞ライセートを用いて抗 SMN 抗体でのウェスタンブロットを行ったところ、20 時間後でも SMN のバンドシフトが観察され、DCL は長時間の影響を及ぼすことが明らかになった (Figure 30D)。

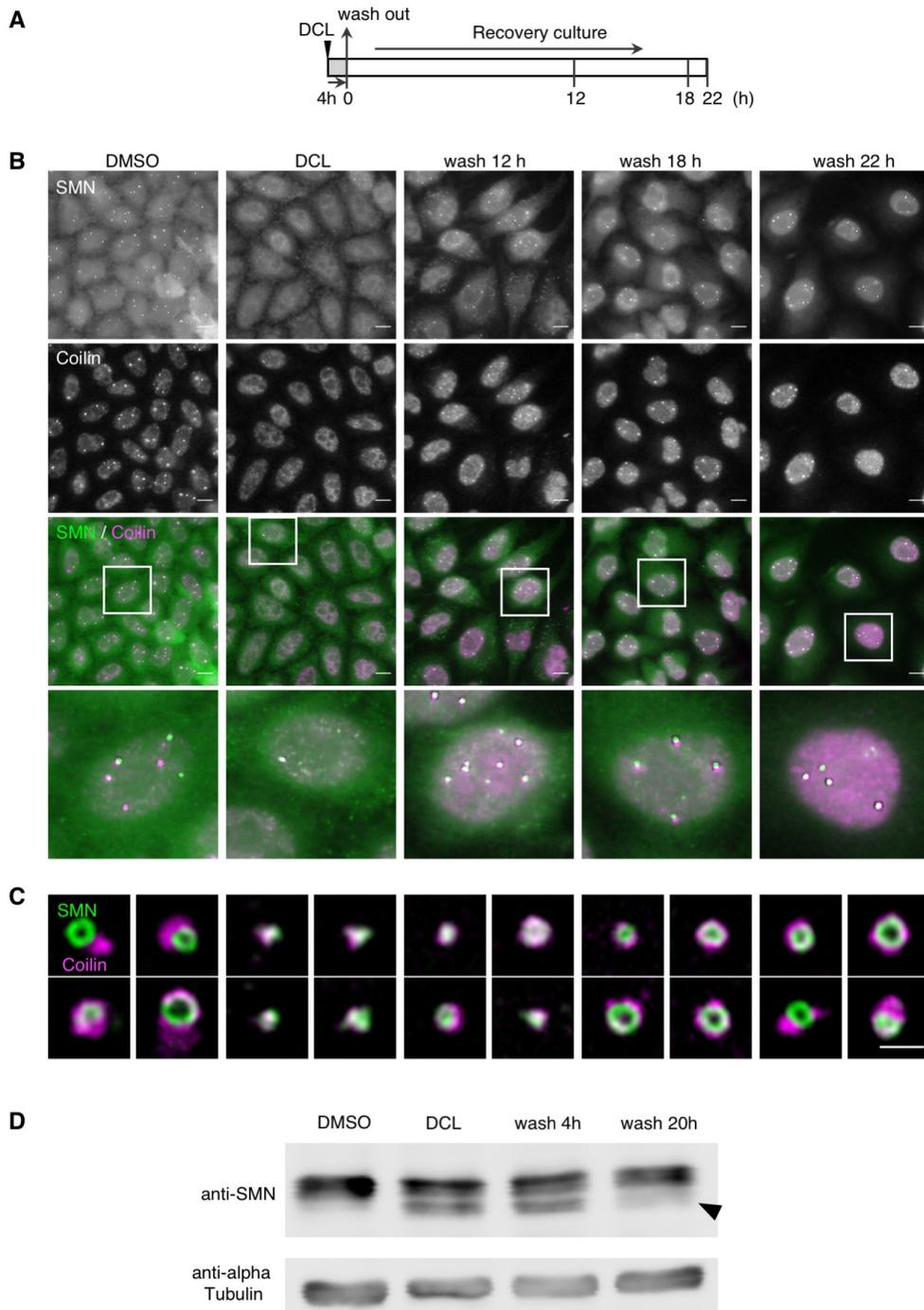


Figure 30

### DCL 処理から回復時のカハール体形成過程

(A) DCL (20  $\mu$ M) で 4 時間処理した HeLa 細胞から DCL 除去後 9、12、15、18、22 時間後に固定し、抗 SMN 抗体および抗 coilin 抗体で二重染色を行なった。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B) (A)の白枠の拡大図。(C) (A)の核内の輝点を超解像顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは 1  $\mu$ m。(C) DCL (20  $\mu$ M) で 4 時間処理した HeLa 細胞と、DCL 除去後 4 時間後、20 時間後の細胞の細胞抽出液を用いて SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。Wash 後 20 時間後でも SMN でシフトしたバンドが観察された。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。

## 考察

### DCL による SMN のシステイン修飾とカハール体形成能の低下

本研究により、DCL により SMN のシステイン残基に修飾が起こることが明らかになり、それに伴いカハール体と Gem が消失することが明らかになった。この際、カハール体形成に影響を及ぼすシステイン残基は第一章で述べた YG ボックス周辺のシステイン残基である。この位置関係より、これらのシステイン残基に修飾が起こることで SMN の YG ボックスを介した多量体形成が妨げられる可能性が考えられる。DCL 処理を行い、残存したカハール体の構造を超解像顕微鏡で観察した Figure 29 より、SMN と Coilin の分離構造が壊れ、SMN と Coilin が分離していない。SMN の分離が SMN の多量体形成によるという第一章での考察から、DCL により多量体形成ができないと予想された。したがって YG ドメイン、多量体形成を行うドメイン周辺の修飾は分離、Gem 形成を防ぐと結論付けた (Figure 31A)。これを明らかにするために、これらのシステイン残基の修飾により多量体形成が妨げられているか検討が必要である。

また、第一章の YG ボックスの変異体 SMN Y272C 変異体ではカハール体は消失するのではなく歪でサイズの大きな輝点を形成し、本章の YG ボックス周辺の修飾ではカハール体が消失しており違いがある。これは、Figure 17 より DCL の作用は SMN のみではなく、Coilin の輝点にもあり、作用点が SMN のみではないことが関わっていると考えられる。そこで第三章では DCL の SMN 以外の作用点に着目する。

### DCL 除去によるカハール体再形成

第一章のハルミン処理では PNC 移行後の回復培養でカハール体の再形成が早期に起こることが特徴であった。一方、DCL ではカハール体や Gem 消失後に回復培養を行った場合、カハール体や Gem の回復に長時間かかることが示された。また Figure 30D のウェスタンブロットで DCL 除去から 20 時間が経過した後にも SMN のバンドシフトが残っており、DCL 処理の影響は長時間残っている。これは DCL が標的タンパク質のシステイン残基に共有結合で非可逆的な結合を行うということと、SMN のシステイン残基に共有結合で修飾を行うといういずれか、もしくは両方の特徴を示した結果であると考えられる。

また、カハール体再形成においては、ハルミンと DCL は同様に形成初期では SMN と Coilin が同程度のサイズの輝点で重なるように形成され、時間経過により、SMN がリング状になったことから、正常なカハール体形成過程として、サイズの増大に伴う SMN のクラスター化という過程があることを反映している可能性が高まったと言える。

## DCL による SMN のシステイン修飾

DCL により SMN のシステイン残基に修飾が起こることが明らかになった。脂質過酸化で主に産生される反応性アルデヒドである 4-HNE は DCL と同様のカハール体や Gem の消失や SMN のウェスタンブロットのバンドシフトをもたらしたが、DCL により起きる修飾は 4-HNE 修飾ではないことが Figure 23B の抗 4-HNE 抗体でのウェスタンブロットにより示唆された。ここで、エタクリン酸での SMN のバンドシフト幅が DCL とズレが生じていた (Figure 21B) ことから、エタクリン酸や DCL によるレドックスストレスで生じる反応性アルデヒド産物は、どのような化合物を作用させたかにより異なっていることが予想される。また、DCL によるバンドシフトは比較的ブロードなバンドであることが多いことから、複数種類の反応性アルデヒドが結合する可能性も考えられる。つまり DCL 処理により一部は 4-HNE が発生し、SMN に結合することを否定できないが、他の反応性アルデヒドが結合することも考えられる。DCL 処理により SMN が核内に蓄積することから、修飾は核内で起きることが予想されるが、細胞の核内に多く存在する反応性アルデヒドについては調べられておらず、予想することはできない。そこで今後、質量分析等により DCL に結合する反応性アルデヒドを明らかにすることが望まれる。

## SMN のシステインの修飾が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症に関与している可能性

SMN が原因遺伝子となっている SMA と ALS には類似性がある。SMN は SMN1 を主な原因遺伝子とし、SMN 量の低下によって引き起こされる、下位運動ニューロンの変性を主徴とする、乳幼児期から発症する疾患である。一方 ALS は SMN1 を含まない C9orf72、SOD1、FUS、TDP43 など複数の遺伝子が原因遺伝子として知られ、上位・下位の運動ニューロンの変性を引き起こす。発症時期も成人であり SMA とは異なる。しかし、ALS モデルマウスでは SMN2 のコピー数、つまり SMN の発現量に病態が影響され、SMN の発現量と ALS モデルマウスのニューロンの細胞死が逆相関している<sup>95</sup>こと、ALS 患者では Gem が減少することであると知られている。これらのことから SMN の機能も ALS に関わっていると考えられる。

ALS 患者の脊髄組織の SMN のウェスタンブロットを行った論文では SMN は 2 本のバンドとして検出されており、移動度の高いバンドは SMN2 から産生される SMN  $\Delta 7$  とされている<sup>96</sup>。しかし SMN  $\Delta 7$  の方が全長の SMN よりもウェスタンブロットのバンドは濃くなっており、SMN2 遺伝子からの  $\Delta 7$  mRNA の発現量は SMN1 の 1/10 である<sup>96</sup>ということと矛盾している。定量的結果、全長の SMN である移動度の低いバンドが減少しており、SMN  $\Delta 7$  バンドは変わらないという結論になっている<sup>96</sup>が、これは移動度の高いバンドが増えているとも捉えられる結果である。

我々は、本研究により検出された DCL による SMN のシフトバンドが  $\Delta 7$  のバンドに混ざって検出され、ALS では修飾型が増えているという結果である可能性もあるのではないかと考えている。実際に DCL によるバンドの移動度は、SMN  $\Delta 7$  の移動度と同程度であった (Figure 31B)。この ALS 患者で見られる SMN のバンドが SMN の修飾型かを確認するためには、修飾特異的 SMN 抗体が必要である。そのためには SMN のシステイン修飾にどのようなものがあるかを患者に近い組織で同定する必要がある。

また、ALS では酸化ストレスの増加が運動ニューロン死に関与しているという仮説を支持する証拠が提供されている<sup>97</sup>。病理学的研究により ALS 患者の死後組織では脂質過酸化のマーカである 4-hydroxy-2-nonenal-histidine と crotonaldehyde-lysine の付加体<sup>98</sup>や DNA の酸化マーカである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)<sup>99</sup> などの酸化ストレスが増加していることが報告されている。また、ALS 患者の脳脊髄液を用いた研究は疾患の早期でも行われ、8-OHdG<sup>100, 101</sup> や、脂質過酸化のマーカである 4-HNE<sup>91, 92</sup> など酸化ストレスマーカーの上昇が報告されている。

つまり ALS 患者で酸化ストレスが増加したことで 4-HNE などが増加して、SMN に修飾をもたらし、SMN が機能しなくなることにより運動ニューロンの細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。

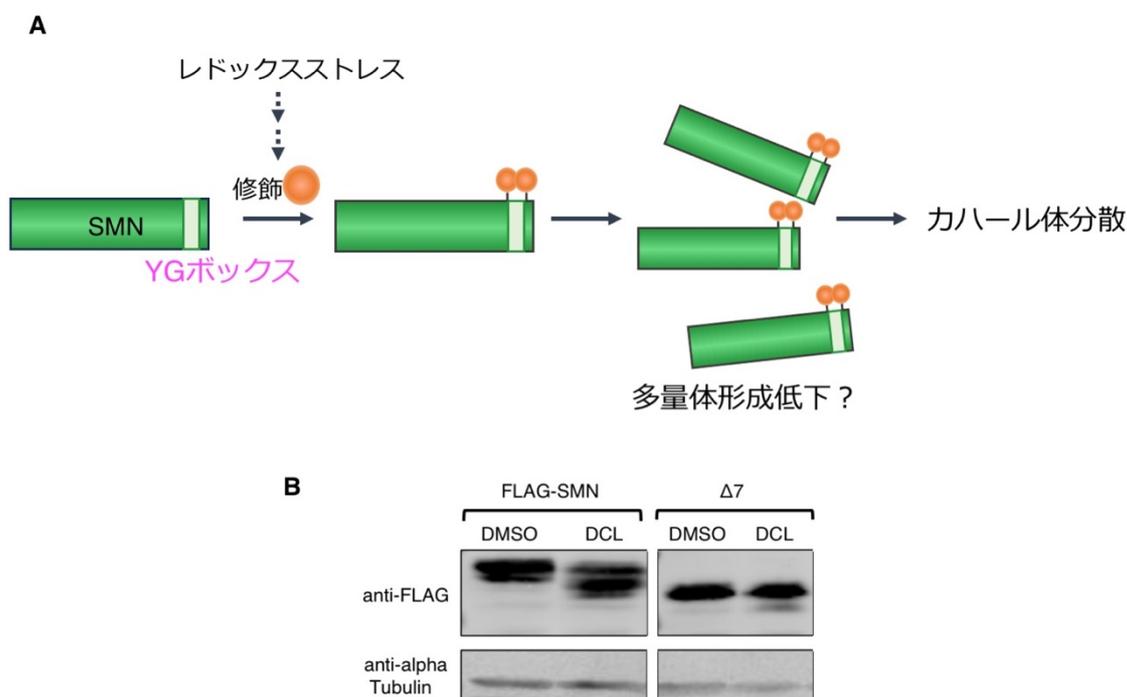


Figure 31

### まとめ

(A) 第二章まとめの図 (B) HeLa 細胞に FLAG tag 融合 SMN と SMN  $\Delta 7$  を一過的に発現させ、DCL (20  $\mu$ M) で 4 時間処理した細胞の細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。alpha Tubulin をローディングコントロールとして用いた (下段)。

## 第三章

### DCL の他の作用点の解析

## 結果

### DCL 処理により発現変動する遺伝子群の解析

Figure17 より DCL のカハール体分散効果は、SMN、Coilin の双方の輝点の消失を行っており、SMN に対する作用は第 2 章で述べた通りであるが、Coilin の輝点消失するメカニズムは明らかになっていない。そこで、作用点を明らかにすることを目的に DCL 処理後の HeLa 細胞の RNA を用いて RNA-sequence を行った。Gene Ontology (GO) 解析を行い、DCL 処理により発現が変動した遺伝子群を Table 8 に示した。発現が上昇した遺伝子群に KDM ファミリーと呼ばれるヒストンのリジンの脱メチル化酵素群が含まれていることが明らかになった。

Table 8 RNA sequence により DCL により発現量が変動した遺伝子群

	GO-term	# of ref. gene	# of hit	Fold enrichment	P value
Up	histone lysine demethylation	28	13	6.92	8.44E-04
	response to unfolded protein	158	30	2.83	6.14E-03
	transcription, DNA-templated	2586	336	1.94	7.96E-29
	negative regulation of transcription from pol II promoter	772	88	1.7	1.56E-02
Down	chromatin assembly	30	16	11.81	3.73E-10
	chromatin organization	263	73	6.15	1.68E-31
	regulation of gene expression, epigenetic	51	13	5.64	2.24E-04
	rRNA metabolic process	117	17	3.22	8.77E-03
	mRNA splicing, via spliceosome	173	21	2.67	1.62E-02

発現が上昇した histone lysine demethylation gene  
KDM4A, JMJD1C, KDM5A, KDM3A, PHF8, KDM4D, KDM2A, KDM7A, PHF2, KDM4C, KDM6A, JMJD6, KDM6B

DCL 処理により発現量が増加した遺伝子群を Up、低下したものを Down で示した。

この酵素群は、フラビン依存的脱メチル化酵素 (LSD) と Jumonji C ドメインを持つ Fe<sup>2+</sup>、2-オキソグルタル酸 (2-OG) 依存的脱メチル化酵素 (Jumonji C domain-containing histone demethylase : JHDM) の 2 種類がある<sup>102</sup>。その中でも DCL 処理により発現が上昇するのは JHDM であった。2-OG オキシゲナーゼファミリーは 60 種類以上のタンパク質により構成され、ヒストン脱メチル化酵素は 20 以上含まれる。このファミリーのタンパク質の触媒ドメインは Jumonji C ドメインであり 8 本の  $\beta$  ストランドをもつ二本鎖  $\beta$  ヘリックス構造を持つ<sup>103</sup>。酵素反応では 2-OG と酸素分子の結合によって酵素が活性化し、反応性の Fe(IV)-オキソフェリル中間体となり、特定の基質の水酸基と反応し、基質をヒドロキシル化する。その際、CO<sub>2</sub> とコハク酸が形成される。その後、不安定なヒドロキシル化された基質は不安定なヘミアミナル中間体であり、ホルムアルデヒドが放出され、基質の脱メチル化が起きる。

JmjC KDM の一部は精製された JmjC KDM とヒストン、非ヒストン基質を反応させた後の基質の質量分析によって、ヒストンのリジンのみではなく、ヒストンやヒストン以外の基質のアルギニンも脱メチル化すると報告されている<sup>104</sup>。

### KDM ファミリーのノックダウンによりカハール体消失が抑制される

KDM ファミリーが DCL によるカハール体消失に影響を及ぼしているのではないかと考え、DCL により発現が上昇した KDM ファミリーのうち HeLa 細胞での発現量が多い KDM3A と KDM4A をノックダウンし、カハール体を SMN と Coilin の抗体染色により観察した。その結果、ノックダウン自体は DMSO 処理時のカハール体の局在に影響を及ぼさないが、DCL 処理を行うとカハール体の分散が一部抑えられることが明らかになった (Figure 33A)。また、KDM3A、4A の単独ではなく、双方を同時にノックダウンした場合の方が DCL による分散の抑制効果は強く、複数の KDM ファミリーが関与していることが示唆された (Figure 32A)。

第 2 章では DCL により SMN のシステイン 146 に修飾が起こることにより SMN の SDS-PAGE のバンドシフトが見られた。KDM ノックダウン時にこのバンドシフトに変化が見られるかを調べるために、抗 SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果ノックダウンの有無によらず SMN のバンドシフトは観察された (Figure 32B)。つまり、KDM のノックダウンは DCL によるカハール体の分散を抑制するが SMN の C146 のシステインへの修飾には影響を及ぼさないことが示された。

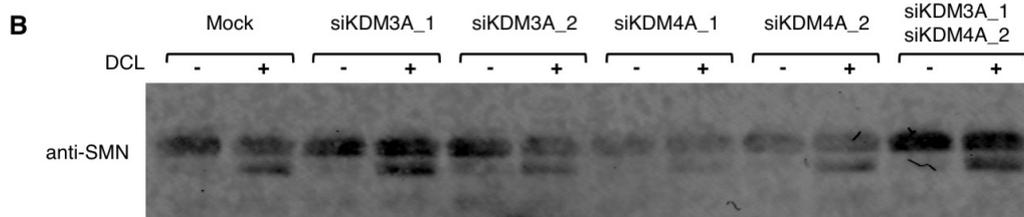
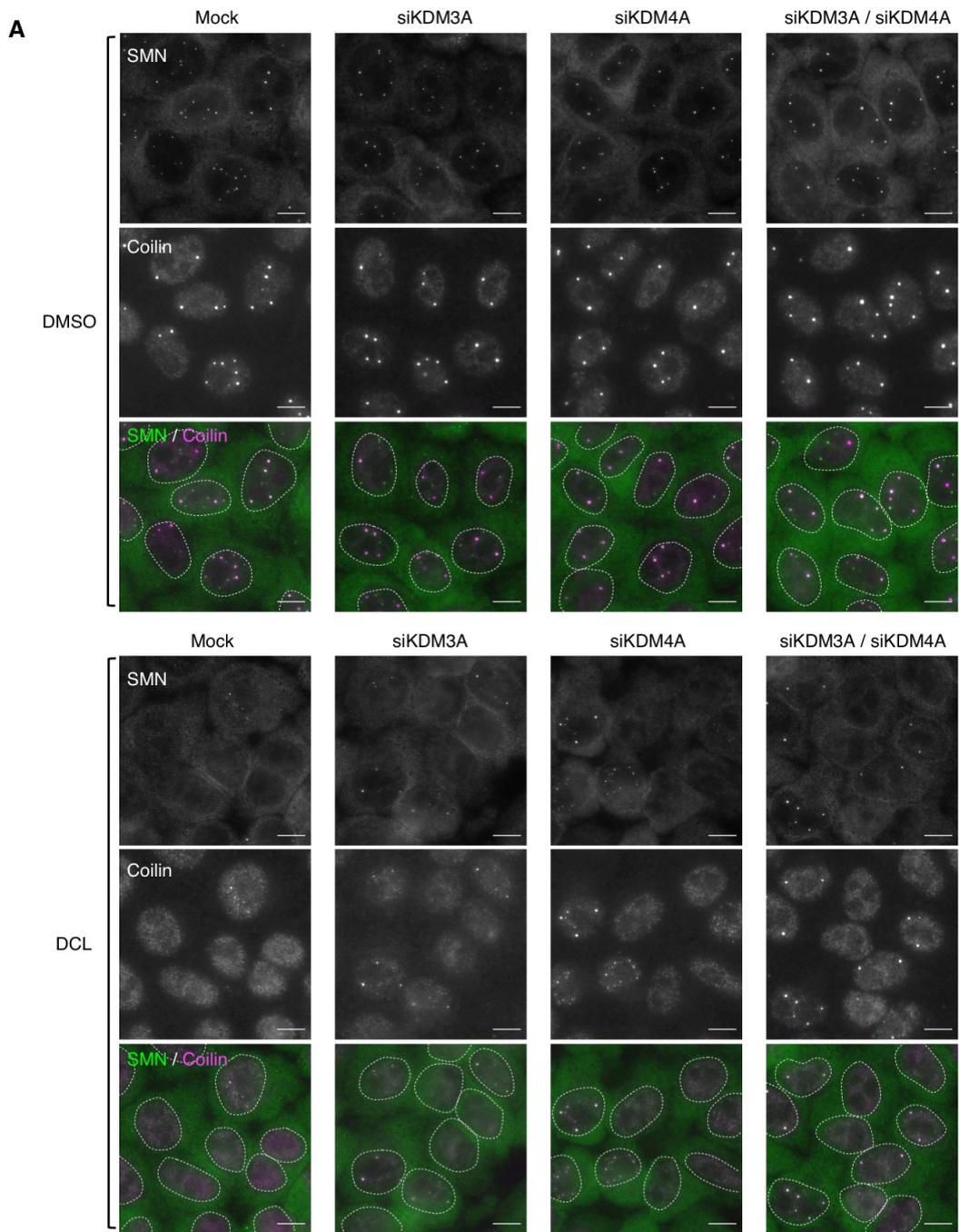


Figure 32

### KDM3A、4A のノックダウンにより DCL によるカハール体、Gem の消失は抑制される

(A) HeLa 細胞の KDM3A と KDM4A を siRNA によりノックダウンした 72 時間後に DCL 処理を行い、固定後、抗 SMN 抗体と抗 Coilin 抗体で二重染色を行い、カハール体/Gem を観察した。破線は核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。 (B) HeLa 細胞の KDM3A と KDM4A を siRNA によりノックダウンした 72 時間後に DCL 処理を行い、細胞抽出液とした。これを用い抗 SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。

### KDM ファミリーの阻害剤 JIB-04 でもカハール体消失を抑制される

次に KDM ファミリーの阻害剤でもカハール体への影響が見られるかを観察した。KDM ファミリーの阻害剤として IOX1、GSK-J4、CP2、JIB-04 を用いた。IOX1、GSK-J4 は 2-OG のアナログであり 2-OG の結合を阻害することが知られている。CP2 は環状ペプチドで KDM4A の活性中心にはまり込んで阻害し、JIB-04 は KDM の活性部位における O<sub>2</sub> およびヒストンの基質の結合を阻害する。また活性中心の金属をキレートすることで、共役基質である 2-OG の結合力を変化させる可能性もある阻害剤である<sup>105</sup>。

IOX1、GSK-J4、CP2、JIB-04 と DCL 処理を同時処理し、カハール体の局在を観察したところ IOX1、GSK-J4、CP2 処理時では DCL によるカハール体分散に影響は見られなかったが、JIB-04 と DCL との同時処理ではカハール体分散が抑制されることが示された (Figure 33A、データ未提示)。また JIB-04 の単独処理時に、Coilin と SMN の輝点が一致している輝点の割合が DMSO 処理時と比べ増加した (Figure 33A)。そこで、JIB-04 処理時のカハール体について超解像顕微鏡を用いて微細構造の観察を行った (Figure 34A)。その結果、DMSO 処理時では第 1 章、第 2 章でも述べたとおり、SMN と Coilin は分離し、SMN はリング状に観察されるものが多いのに対し、JIB-04 処理によりこの分離構造とリング状の局在は観察されずに両者が混ざったような局在を示した。JIB-04 と DCL を同時処理した際も、分散しなかったカハール体が JIB-04 処理時と同様の両者が混ざった局在を示した。よって JIB-04 処理がカハール体の内部構造を変化させることが明らかとなった。

なお、JIB-04 処理時にウェスタンブロットにより SMN のバンドを観察したところ、DCL 処理によりバンドシフトを起こしており (Figure 34B)、第 2 章で述べた C146 の修飾は JIB-04 により抑制されないことが示された。このことから、他の SMN のシステイン残基修飾も JIB-04 では低下しないことが予想され、JIB-04 処理が DCL で誘導されるカハール体分散を抑制するメカニズムは SMN 側ではなく、SMN の分離を起こさせない Coilin 側の変化である可能性が考えられた。

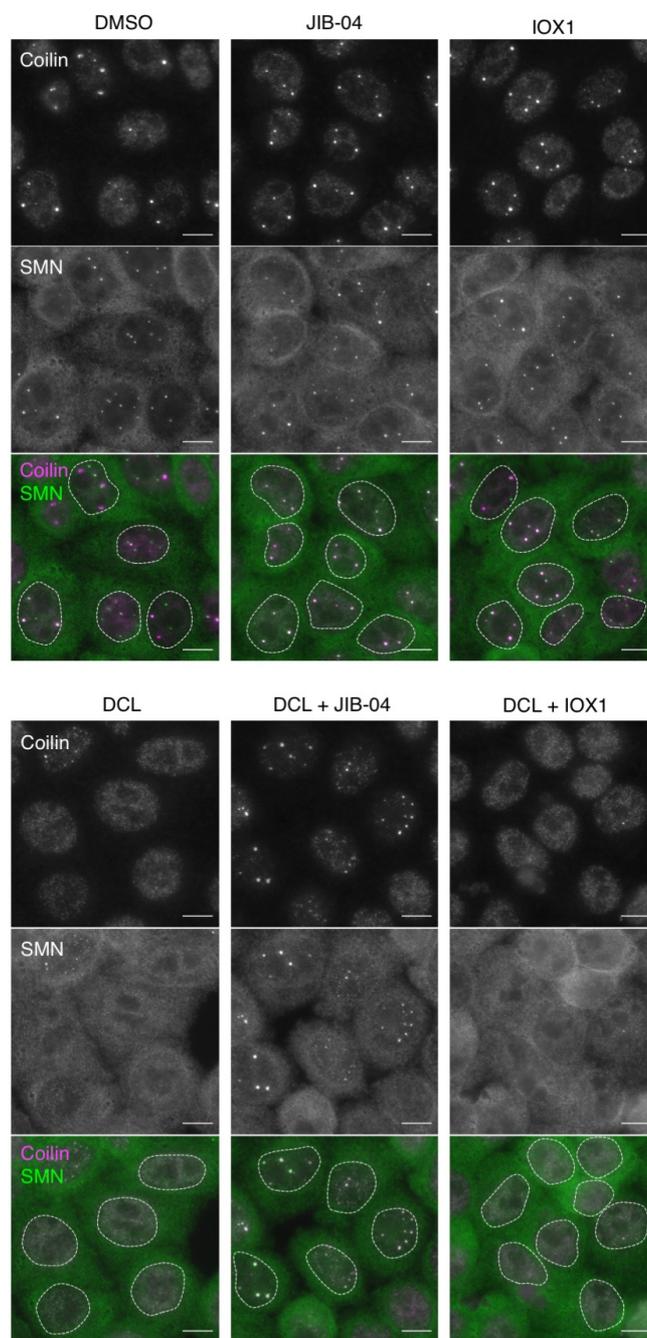


Figure 33

KDM ファミリーの阻害剤 JIB-04 によりカハール体、Gem の消失は抑制される

HeLa 細胞に DCL 処理と同時に KDM ファミリー阻害剤処理を行い、固定後、抗 SMN 抗体と抗 Coilin 抗体で二重染色を行い、カハール体/Gem を観察した。破線は核の輪郭を示した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

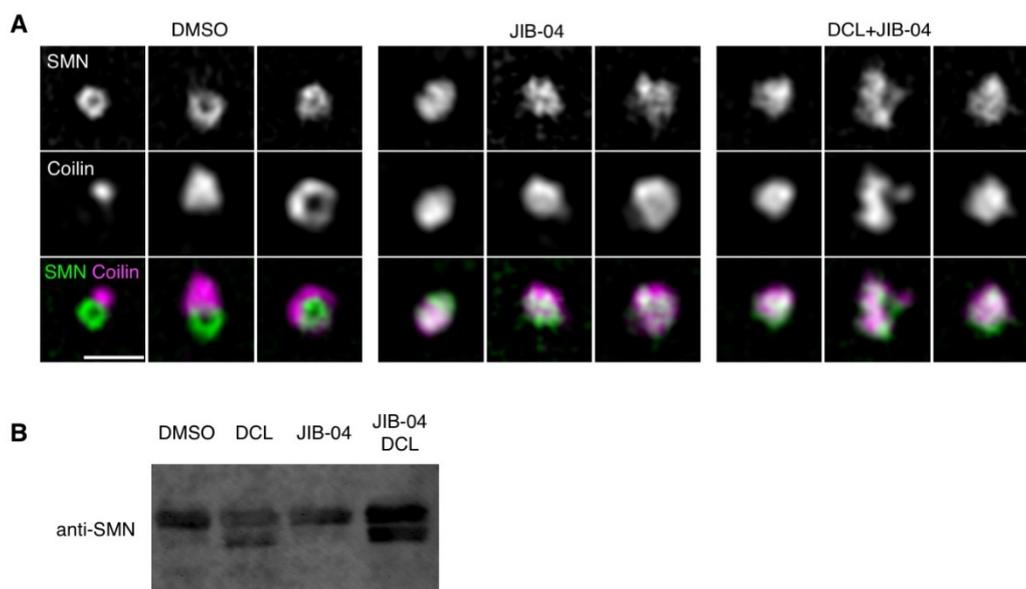


Figure 34

#### JIB-04 処理により Coilin と SMN の分離構造が消失する

JIB-04 処理時の SMN と Coilin が局在するカハール体について超解像顕微鏡で観察し、SIM 画像を得た。スケールバーは  $1\ \mu\text{m}$ 。(B) JIB-04 と DCL 処理を同時に 4 時間行い、細胞抽出液とした。これを用い抗 SMN 抗体でウェスタンブロットを行った。

#### Coilin の SDMA の変化は DCL によるカハール体消失に影響を及ぼさない

カハール体形成では SMN の tudor ドメインが Coilin の RG ドメインの対称的にジメチル化された部位 (SDMA) に相互作用することが重要であった。そのため、DCL 処理により KDM 活性が上昇して Coilin のアルギニン脱メチル化が亢進することが分散の原因で、その脱メチル化が JIB-04 で抑制される可能性を考えた。そこで、Coilin の DCL 処理後の SDMA を検出したところ (Figure 35A)、DCL 処理により Coilin の SDMA レベルは低下する傾向が見られたが、JIB-04 と DCL の同時処理でもこの修飾低下は抑制されなかった。つまり、JIB-04 と DCL の同時処理というカハール体分散の抑制条件でも SDMA は低下しており、KDM によるカハール体分散の抑制は Coilin の SDMA の調節には依存しないことが示された。

#### KDM と Coilin の結合は弱く相互作用する

KDM ファミリーがカハール体の形成に影響する理由として、Figure 35A より KDM タンパク質による脱メチル化ではないこと、KDM ファミリーの阻害剤が JIB-04 のみに限られることから、KDM と Coilin、SMN の結合に注目した。そこで、KDM4A と Coilin の結合について、免疫沈降で検討した (Figure 35B)。その結果、量は少ないが共沈降することが示された。また Coilin の各欠失変異体を用いて、KDM4A を共沈降した結果、Coilin の複数の欠失変異体で結合が弱まることが明らかとなり、結合は 1 箇所ではなく

複数箇所で弱い相互作用をしている可能性が示された。しかし、SMN と KDM4A の結合は検出されなかった (データ未提示)。このことから、KDM が直接 Coilin と SMN の間をつなぐ可能性は否定された。

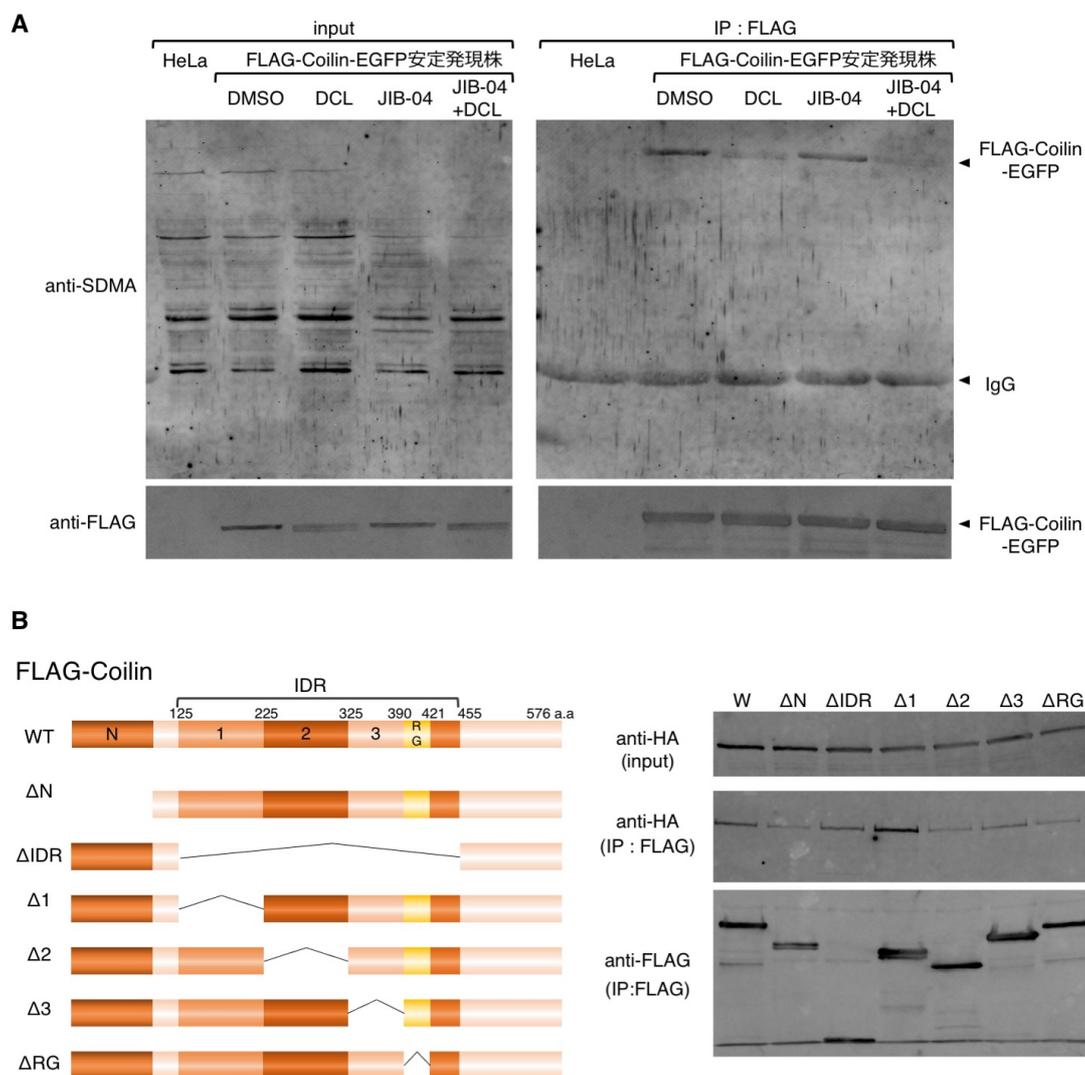


Figure 35

### SMN、SMN C146A 変異体は 4-HNE 修飾が起こる

(A) HeLa 細胞に FLAG-Coilin-EGFP を安定発現させた細胞株を用いた。この細胞株に培地交換で DCL (20  $\mu$ M)、JIB-04 (20  $\mu$ M)、DCL (20  $\mu$ M) と JIB-04 (20  $\mu$ M) を同時に添加し 4 時間培養した。FLAG tag で免疫沈降を行い、ウェスタンブロットを行った。抗 FLAG 抗体と SDMA の認識抗体である抗 SYM10 抗体で検出した。DCL、DCL と JIB-04 の同時添加により抗 SDMA 抗体で検出されるバンドの濃さは低下した。(B) 左: 発現させた Coilin の欠失変異体の模式図。右: 293T 細胞に FLAG tag 融合タンパク質として Coilin、Coilin の欠失変異体と HA tag 融合タンパク質として KDM4A を一過性に過剰発現させた。FLAG tag で免疫沈降し、ウェスタンブロットを行い、抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体で検出した。

## 考察

### KDM ファミリーと通常時のカハール体形成調節

KDM ファミリーの阻害剤である JIB-04 処理時にカハール体の微細構造を超解像顕微鏡で観察した結果、Coilin と SMN の分離構造が崩壊していた。このことから、通常時に KDM ファミリーはカハール体内部で Coilin と SMN を分離させる過程において役割を持つ可能性が考えられる。KDM4A と Coilin は複数の点で弱い相互作用があり、Coilin に KDM ファミリータンパク質が相互作用することで、カハール体での分離を補助している可能性も考えられる。また、もう一つの可能性として、JIB-04 と結合した KDM ファミリーがカハール体内で、SMN や Coilin をつなぎ止める新たな多価の相互作用を担う分子になっている可能性も考えられる。しかし、JIB-04 存在下での KDM の局在を観察したところ、KDM は核質に広がった局在を示しており、カハール体に濃縮する様子は観察されなかったこと、KDM のノックダウンでもカハール体の分散が抑制されることから、KDM がカハール体の新たな「つなぎ」となっている可能性はそれほど高くない。

### KDM ファミリーと DCL 処理時のカハール体形成調節

KDM3A、4A のノックダウンおよび KDM ファミリーの阻害剤である JIB-04 処理により DCL によるカハール体の消失が抑制された。このことから、DCL 処理時に KDM の働きがカハール体の分散に関与することが示唆され、第 2 章で示した SMN 以外の DCL の作用点が KDM であることが示唆された。KDM がどのようにカハール体分散に関わるのか、JIB-04 がそれをどう抑えるのかは前の段落でも述べた通りメカニズムは不明である。ただし、カハール体分散が抑制される JIB-04 と DCL の同時処理でも Coilin の SDMA 修飾量は DCL 単体処理時と変化が見られず、KDM の JIB-04 による調節は Coilin の SDMA 修飾の脱メチル化活性の抑制によるものではないことが示唆された。ただし、本研究で Coilin の過剰発現条件で行なっており、内在の Coilin のメチル化に変化が起きていないことは断定出来ず、内在での検討が今後必要である。また、実験操作中にライセート中に DCL が含まれることにより、Coilin が脱メチル化を受ける可能性も否定出来ず、今後検討が必要である。

また、脱メチル化活性の抑制が JIB-04 の効果に重要ではないことは、KDM ファミリーの阻害剤でカハール体分散を抑制するのは JIB-04 のみであったことから支持される。JIB-04 は KDM の基質との結合を阻害する阻害剤であり、酵素活性中心に結合して補因子である 2-OG の結合阻害を行う IOX1 や GSK-J4 がカハール体分散を抑制できないことから、基質との結合がカハール体分散の抑制に必要と考えられる。しかし、DCL によるカハール体分散過程で、KDM ファミリータンパク質がどのようなタンパク質との相互作用を介して作用するかは今後解決すべき課題として残されている。

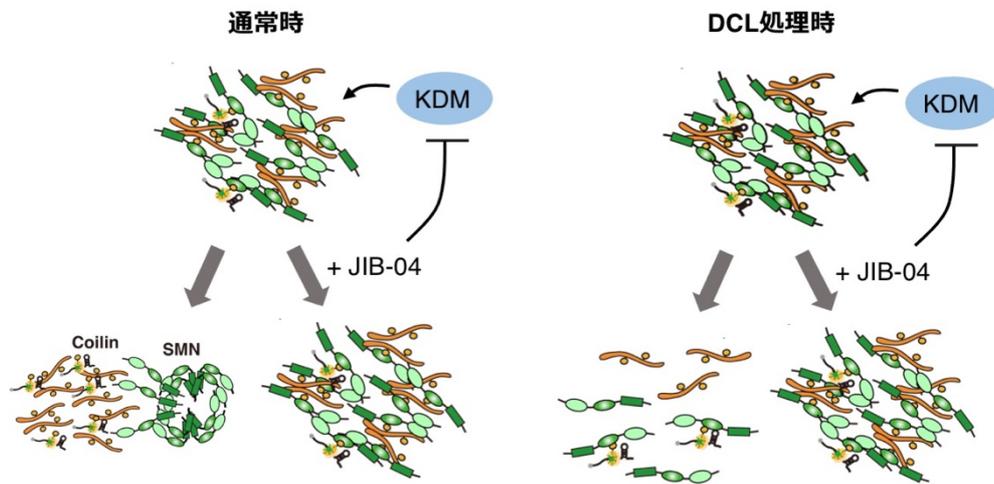


Figure 36

第三章まとめ

左: 通常時の KDM ファミリーのカハール体形成における役割のモデル。右: DCL 処理時のカハール体形成の役割のモデル。

## 総括

### SMA 発症の新たな機序の解明

これまで SMN の YG ボックスの変異による SMA は SMN シャペロン活性の低下により snRNP のアセンブリが低下し疾患を起こすと考えられていた。本研究により、SMN の YG ボックスの変異により SMN の多量体形成が低下したことによりカハール体から SMN の分離の阻害が起こることが示された。この結果、SMN がリサイクルされなくなり、核内に蓄積する。つまり、核内へのトラップによるフリーな SMN の減少を意味し、使用できる十分な SMN の分子数がなく SMA となるという新たな SMA の発症機序を提案する。

本研究において、SMN Y272C 変異体の発現は内在の SMN 存在下で行なっている。それにも関わらず SMN Y272C 発現細胞ではカハール体の拡大、SMN の分離の低下が見られた。現在の SMA の治療方法は SMN を補充するという戦略であるが、このような変異を持つ患者ではドミナントネガティブな効果を示し、治療に不十分となる可能性を示している。したがって、SMN Y272C のような SMN の多量体形成を引き起こす変異を持つ患者に対する治療として、これら変異 SMN が存在していても SMN のリサイクルを可能にする戦略が必要となるのではないかと考えられる。

### 局所翻訳と SMN の働き

SMN はここまでに述べた snRNP の生合成のほか、局所翻訳にも役割を持っている。

神経細胞のような巨大な細胞では、通常の翻訳は細胞核が存在している細胞体のリボソームによって行われる。一方で一部の mRNA では局所翻訳と呼ばれる、神経軸索を輸送され軸索や樹状突起に存在するリボソームによる翻訳が起こる。この局所翻訳は、軸索末端では成長円錐の伸展や前シナプスの構造変化<sup>106, 107</sup>、樹状突起では後シナプス構造であるスパインの成熟化やシナプス長期増強、長期記憶形成<sup>108, 109, 110</sup>に必須であり、神経の機能に重要である。これらの局所翻訳される mRNA は RNA やタンパク質からなる顆粒を形成した状態で輸送される。

SMN この mRNA の軸索末端への輸送にも関与しており、神経細胞の細胞体から軸索上を  $\beta$ -アクチンの mRNA<sup>111, 112</sup> や HuD<sup>113, 114</sup> や Gemin2<sup>115</sup> や Gemin5<sup>112</sup> のような RNA 結合タンパク質と結合して移動しているということが報告されている。

SMN はあらゆる細胞で発現しているが、SMA で細胞死が引き起こされるのは下位運動ニューロンのみである。このことから、SMN の減少によるニューロンでの局所翻訳における輸送の低下が SMA の原因であるとも考えられている<sup>115, 116</sup>。本研究における SMN の多量体形成によるカハール体からの SMN の分離のメカニズムは、多量体形成の低下により細胞質のフリーの SMN の分子数の低下を引き起こすことで局所翻訳の低下が起こり、運動ニューロンの生存に関与している可能性がある。また、このメカニズ

ムは SMA のみではなく、第二章の考察で述べた ALS における SMN の変化を考えると ALS での細胞死にも関与している可能性があり、局所翻訳の変化の検出を含め、更なる研究が必要である。

## 参考文献

1. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
2. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
3. Will, C. L. & Luhrmann, R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003707–a003707 (2011).
4. Machyna, M. *et al.* The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through cajal bodies. *Mol. Cell* **56**, 389–399 (2014).
5. Novotný, I., Blažíková, M., Staněka, D., Herman, P. & Malinsky, J. In vivo kinetics of U4/U6·U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* **22**, 513–523 (2011).
6. Strzelecka, M. *et al.* Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 403–409 (2010).
7. Yong, P. J., Le, T. T., Thi Man, N., Burghes, A. H. M. & Morris, G. E. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp. Cell Res.* **256**, 365–374 (2000).
8. Sleeman, J. E., Ajuh, P. & Lamond, A. I. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J. Cell Sci.* **114**, 4407–4419 (2001).
9. Lemm, I. *et al.* Ongoing U snRNP Biogenesis Is Required for the Integrity of Cajal Bodies. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3221–3231 (2006).
10. Lafarga, M., Berciano, M. T., Garcia-Segura, L. M., Andres, M. A. & Carmo-Fonseca, M. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J. Neurocytol.* **27**, 205–217 (1998).
11. Schul, W., van Driel, R. & de Jong, L. Coiled Bodies and U2 snRNA Genes Adjacent to Coiled Bodies Are Enriched in Factors Required for snRNA Transcription. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1025–1036 (1998).
12. Izaurralde, E. *et al.* A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**, 709–712 (1995).

13. Izaurralde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. & Mattaj, I. W. A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J. Cell Biol.* **118**, 1287–1295 (1992).
14. Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. & Mattaj, I. W. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**, 187–198 (2000).
15. Hallais, M. *et al.* CBC-ARS2 stimulates 3' -end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1358–1366 (2013).
16. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051–1060 (1997).
17. Suzuki, T., Izumi, H. & Ohno, M. Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J. Cell Biol.* **190**, 603–612 (2010).
18. Young, P. J. *et al.* The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2869–2877 (2000).
19. Otter, S. *et al.* A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 5825–5833 (2007).
20. Shpargel, K. B. & Matera, A. G. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17372–17377 (2005).
21. Girard, C., Neel, H., Bertrand, E. & Bordonné, R. Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2925–2932 (2006).
22. Friesen, W. J. *et al.* The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8289–8300 (2001).
23. Brahm, H., Meheus, L., De Brabandere, V., Fischer, U. & Lührmann, R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna* **7**, 1531–1542 (2001).
24. Chari, A. *et al.* An Assembly Chaperone Collaborates with the SMN Complex to Generate Spliceosomal SnRNPs. *Cell* **135**, 497–509 (2008).
25. Battle, D. J. *et al.* The Gemin5 Protein of the SMN Complex Identifies snRNAs. *Mol. Cell* **23**, 273–279 (2006).

26. Pánek, J. *et al.* The SMN complex drives structural changes in human snRNAs to enable snRNP assembly. *Nat. Commun.* **14**, 1–18 (2023).
27. Yong, J., Wan, L. & Dreyfuss, G. Why do cells need an assembly machine for RNA–protein complexes? *Trends Cell Biol.* **14**, 226–232 (2004).
28. Hebert, M. D., Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E. & Matera, A. G. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell* **3**, 329–337 (2002).
29. Tripsianes, K. *et al.* Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1414–1420 (2011).
30. Jády, B. E. *et al.* Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J.* **22**, 1878–1888 (2003).
31. Staněk, D. & Neugebauer, K. M. The Cajal body: A meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* **115**, 343–354 (2006).
32. Morris, G. E. The Cajal body. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1783**, 2108–2115 (2008).
33. Liu, Q. & Dreyfuss, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* **15**, 3555–3565 (1996).
34. Lefebvre, S. *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy–determining gene. *Cell* **80**, 155–165 (1995).
35. Monani, U. R. *et al.* A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1177–1183 (1999).
36. Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J. & Wirth, B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6307–6311 (1999).
37. Markowitz, J. A., Singh, P. & Darras, B. T. Spinal muscular atrophy: A clinical and research update. *Pediatr. Neurol.* **46**, 1–12 (2012).
38. McAndrew, P. E. *et al.* Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN(T) and SMN(C) gene copy number. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1411–1422 (1997).
39. Chen, T. H. New and developing therapies in spinal muscular atrophy: From genotype to phenotype to treatment and where do we stand? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–20 (2020).

40. Schrank, B. *et al.* Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9920–9925 (1997).
41. McWhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H. M. & Beattie, C. E. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J. Cell Biol.* **162**, 919–931 (2003).
42. Hsieh–Li, H. M. *et al.* A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **24**, 66–70 (2000).
43. Monani, U. R. *et al.* The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(–/–) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 333–339 (2000).
44. Singh, R. N., Ottesen, E. W. & Singh, N. N. The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Neurosci. Insights* **15**, (2020).
45. Burghes, A. H. M. & Beattie, C. E. Spinal muscular atrophy: Why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 597–609 (2009).
46. Blatnik, A. J., McGovern, V. L. & Burghes, A. H. M. What genetics has told us and how it can inform future experiments for spinal muscular atrophy, a perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
47. Butchbach, M. E. R. Genomic variability in the survival motor neuron genes (Smn1 and smn2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
48. Narayanan, U., Achsel, T., Lührmann, R. & Matera, A. G. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell* **16**, 223–234 (2004).
49. Martin, R., Gupta, K., Ninan, N. S., Perry, K. & Van Duyne, G. D. The survival motor neuron protein forms soluble glycine zipper oligomers. *Structure* **20**, 1929–1939 (2012).
50. Gupta, K. *et al.* Oligomeric properties of survival motor Neuroon·Gemin2 complexes. *J. Biol. Chem.* **290**, 20185–20199 (2015).
51. Gupta, K. *et al.* Assembly of higher–order SMN oligomers is essential for metazoan viability and requires an exposed structural motif present in the YG zipper dimer. *Nucleic Acids Res.* **49**, 7644–7664 (2021).
52. Lorson, C. L. *et al.* SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* **19**, 63–66 (1998).

53. Pellizzoni, L., Charroux, B. & Dreyfuss, G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11167–11172 (1999).
54. Burnett, B. G. *et al.* Regulation of SMN Protein Stability. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1107–1115 (2009).
55. Maita, H., Tomita, K. & Ariga, H. A split luciferase-based reporter for detection of a cellular macromolecular complex. *Anal. Biochem.* **452**, 1–9 (2014).
56. Urasaki, A., Morvan, G. & Kawakami, K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* **174**, 639–649 (2006).
57. Cloos, P. A. C. *et al.* The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* **442**, 307–311 (2006).
58. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
59. Mi, H., Muruganujan, A. & Thomas, P. D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* **41**, D377–D386 (2012).
60. Wickham, H. *Elegant Graphics for Data Analysis. 2016 [Last accessed 2021 Mar 01] New York Springer-Verlag Available from tidyverse* (2021).
61. Courchaine, E. M. *et al.* DMA-tudor interaction modules control the specificity of in vivo condensates. *Cell* **184**, 3612–3625.e17 (2021).
62. Kii, I. *et al.* Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat. Commun.* **7**, 11391 (2016).
63. Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. & Dreyfuss, G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90**, 1013–1021 (1997).
64. Bohmann, K., Ferreira, J. A. & Lamond, A. I. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol.* **131**, 817–831 (1995).
65. Dunder, M. *et al.* In vivo kinetics of Cajal body components. *J. Cell Biol.* **164**, 831–842 (2004).
66. Handwerker, K. E., Murphy, C. & Gall, J. G. Steady-state dynamics of Cajal body components in the *Xenopus* germinal vesicle. *J. Cell Biol.* **160**, 495–504 (2003).

67. Zhu, L. & Brangwynne, C. P. Nuclear bodies: The emerging biophysics of nucleoplasmic phases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **34**, 23–30 (2015).
68. Wang, J. & Dreyfuss, G. Characterization of Functional Domains of the SMN Protein in Vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 45387–45393 (2001).
69. Yao, R. W. *et al.* Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Mol. Cell* **76**, 767–783.e11 (2019).
70. Seegers, J. C., Ochs, R. L. & Joubert, W. S. The effect of harmine on the localization of the nucleolar proteins C23 and B23. *Eur. J. Cell Biol.* **37**, 213–215 (1985).
71. Burger, K. *et al.* Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* **285**, 12416–12425 (2010).
72. Cao, R. *et al.* DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1557–1563 (2005).
73. Duportail, G. & Lami, H. Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **402**, 20–30 (1975).
74. Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V. J. & Guillén, H.  $\beta$ -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem. Toxicol.* **48**, 839–845 (2010).
75. Sobhani, A. M., Ebrahimi, S.-A. & Mahmoudian, M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **5**, 19–23 (2002).
76. Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R. & Brangwynne, C. P. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 165–182 (2021).
77. Hua, Y. & Zhou, J. Modulation of SMN nuclear foci and cytoplasmic localization by its C-terminus. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2658–2663 (2004).
78. Sprangers, R., Groves, M. R., Sinning, I. & Sattler, M. High-resolution X-ray and NMR Structures of the SMN Tudor Domain: Conformational Variation in the Binding Site for Symmetrically Dimethylated Arginine Residues. *J. Mol. Biol.* **327**, 507–520 (2003).
79. Tian, C. *et al.* Multiplexed Thiol Reactivity Profiling for Target Discovery of Electrophilic Natural Products. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1416–1427.e5 (2017).

80. Huang, J. & Philbert, M. A. Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* **711**, 184–192 (1996).
81. Butturini, E. *et al.* Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
82. Coyle, J. T. & Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (80-. )*. **262**, 689–695 (1993).
83. Lenaz, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)–Bioenergetics* **1366**, 53–67 (1998).
84. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine.* (Oxford university press, USA, 2015).
85. Beal, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 797–803 (2002).
86. Genova, M. L. *et al.* The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Mitochondrial Pathog. From genes apoptosis to aging Dis.* 86–100 (2004).
87. Pryor, W. A. & Squadrito, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **268**, L699–L722 (1995).
88. Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol. Physiol.* **271**, C1424–C1437 (1996).
89. Uchida, K. & Stadtman, E. R. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 4544–4548 (1992).
90. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81–128 (1991).
91. Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P. & Appel, S. H. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol. Off. J. Am. Neurol. Assoc. Child Neurol. Soc.* **44**, 696–699 (1998).
92. Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G. & Appel, S. H. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* **62**, 1758–1765 (2004).
93. Zarkovic, K. 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* **24**, 293–303 (2003).

94. Awasthi, S. *et al.* RLIP76 and Cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4372–4377 (2008).
95. Rodriguez–Muela, N. *et al.* Single–Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. *Cell Rep.* **18**, 1484–1498 (2017).
96. Turner, B. J. *et al.* Overexpression of survival motor neuron improves neuromuscular function and motor neuron survival in mutant SOD1 mice. *Neurobiol. Aging* **35**, 906–915 (2014).
97. Barber, S. C. & Shaw, P. J. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 629–641 (2010).
98. Shibata, N. *et al.* Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* **917**, 97–104 (2001).
99. Ferrante, R. J. *et al.* Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **69**, 2064–2074 (1997).
100. Bogdanov, M. *et al.* Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 652–658 (2000).
101. Ihara, Y., Nobukuni, K., Takata, H. & Hayabara, T. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn–superoxide dismutase mutation. *Neurol. Res.* **27**, 105–108 (2005).
102. Klose, R. J., Kallin, E. M. & Zhang, Y. JmjC–domain–containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 715–727 (2006).
103. McDonough, M. A., Loenarz, C., Chowdhury, R., Clifton, I. J. & Schofield, C. J. Structural studies on human 2–oxoglutarate dependent oxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 659–672 (2010).
104. Walport, L. J. *et al.* Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
105. Højrup, C., Coleman, O. D., Bukowski, J., Clausen, R. P. & Kawamura, A. JmjC–domain–Containing Histone Demethylases. in 263–296 (2019). doi:10.1002/9783527809257.ch11.
106. Lin, A. C. & Holt, C. E. Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.* **26**, 3729–3736 (2007).
107. Jung, H., Yoon, B. C. & Holt, C. E. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 308–324 (2012).

108. Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E. & Sonenberg, N. Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron* **61**, 10–26 (2009).
109. Sutton, M. A. & Schuman, E. M. Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell* **127**, 49–58 (2006).
110. Kang, H. & Schuman, E. M. A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science (80-. )*. **273**, 1402–1406 (1996).
111. Rossoll, W. *et al.* Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* **163**, 801–812 (2003).
112. Todd, A. G., Morse, R., Shaw, D. J., Stebbings, H. & Young, P. J. Analysis of SMN-neurite granules: Core Cajal body components are absent from SMN-cytoplasmic complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 479–485 (2010).
113. Hubers, L. *et al.* HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 553–579 (2011).
114. Fallini, C. *et al.* The Survival of Motor Neuron (SMN) Protein Interacts with the mRNA-Binding Protein HuD and Regulates Localization of Poly(A) mRNA in Primary Motor Neuron Axons. *J. Neurosci.* **31**, 3914 LP – 3925 (2011).
115. Zhang, H. *et al.* Multiprotein Complexes of the Survival of Motor Neuron Protein SMN with Gemins Traffic to Neuronal Processes and Growth Cones of Motor Neurons. *J. Neurosci.* **26**, 8622 LP – 8632 (2006).
116. Zhang, H. L. *et al.* Active Transport of the Survival Motor Neuron Protein and the Role of Exon-7 in Cytoplasmic Localization. *J. Neurosci.* **23**, 6627 LP – 6637 (2003).

## 謝辞

本研究を進めるにあたって 6 年半にわたり、ご指導をいただいた北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室 中川真一教授に深く感謝いたします。自由な研究環境のもと研究を行うことができ、多くの学びを得ることができました。

また、同研究室の米田宏 講師、横井佐織 助教、栗原美寿々 助教に心より感謝致します。米田先生には指導教員として、丁寧な指導をしていただいたことで、日々の研究を進めていくことができました。

RNA 生物学研究室の秘書であった作田香様、吉田由佳様、竹田奈央様に心より感謝致します。研究活動と学校生活双方において手厚く、親身なサポートをして頂きました。そして研究室のメンバーにも心より感謝致します。多くの刺激を受け日々研究に取り組むことができました。

そして、お忙しい中、本博士論文の審査にあたってくださった、生体分子機能研究室の黒木喜美子 准教授、前仲勝実 教授に御礼申し上げます。頂いたコメントにより、より良い論文に仕上げることができました。

本研究の化合物スクリーニングを行うにあたり化合物ライブラリーを、東京大学創薬機構、富山大学和漢医薬学総合研究所（和漢薬の科学基盤形成拠点）より提供していただきました。また、スクリーニングには北海道大学薬学部創薬センターから多大なるご協力をいただきました。深く感謝いたします。

またトランスクリプトーム解析の共同研究を行っていただきました理化学研究所生命機能科学研究センター、バイオインフォマティクス研究開発チームの二階堂愛博士、笹川洋平博士に感謝を申し上げます。

そして、SMN の立体構造解析についてのアドバイスを頂きました徳島大学先端酵素学研究所分子生命科学分野の川越聡一郎博士、斎尾智英博士に感謝を申し上げます。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2119 の支援を受けたものです。

2024 年 3 月 大峽咲希