

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03178

研究課題名(和文)概日時計調節化合物の新規標的探索法の開発と周期・位相制御機構の解明

研究課題名(英文) Development of new target discovery methods for circadian clock regulating compounds and elucidation of period and phase control mechanisms

研究代表者

大川 妙子(西脇妙子)(Ohkawa, Taeko)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30432230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝学的手法による標的同定については、ゲノムワイドノックアウトライブラリーをヒト二倍体細胞株に導入し、約3,000クローンのリズムを測定した。その結果約0.5%のクローンにおいて概日リズムの周期や振幅の変化が観察された。今後は化合物の非存在化、および存在化において測定を行い、化合物に対する応答が野生型と異なる細胞を単離し化合物の標的の同定を目指す。また本手法により、新規概日時計遺伝子を同定できる可能性もある。

概日リズムの周期を短縮する化合物ピクロトキシニンの誘導体展開により1,000倍の高活性を示す化合物が得られた。今後は新規誘導体を用いて再度アフィニティ精製を行い、標的の同定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生理活性は内因性の振動体「概日時計」により制御され、約24時間周期の「概日リズム」を刻む。概日リズム異常は、心血管疾患や代謝異常等の生活習慣病、精神疾患、がんなどと密接な関連がある。また動物の繁殖の季節性は概日時計によって制御されている。概日時計調節化合物の標的の同定を通じて、概日時計発振機構の全貌が解明されれば、上記疾患の予防や治療法の開発、産業動物の繁殖効率の向上など様々な波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：For target identification by genetic methods, a genome-wide knockout library was introduced into a human diploid cell line, and the rhythms of approximately 3,000 clones were measured in 384-well plates. As a result, changes in the period and amplitude of the circadian rhythm were observed in about 0.5% of the clones. Using this system, target of the circadian clock-modulating compound can be identified by isolating clones whose response to the compound differs from that of wild-type cells. This screening system can also be used to identify novel circadian clock genes.

By derivatization of picrotoxinin, a compound that shortens the circadian rhythm cycle, we have obtained a compound that shows approximately 1,000-fold higher activity. We are going to perform affinity purification using the new derivative to identify the target.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 ケミカルバイオロジー 標的の同定

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な生理活性は内因性の振動体「概日時計」により制御され、約 24 時間周期の「概日リズム」を刻む。概日リズム異常は、心血管疾患や代謝異常等の生活習慣病、精神疾患、がんなどと密接な関連がある。また動物は概日時計を用いて日長を測定し、繁殖、渡りなどを決まった季節に行う。概日時計機構の全貌が解明されれば、上記疾患の予防や治療法の開発、産業動物の繁殖効率の向上など様々な波及効果が期待される。

真核生物の概日時計は、概日時計遺伝子により構成される「転写・翻訳のネガティブフィードバックループ」として理解されており、哺乳類の概日時計は、*Bmal1*、*Clock*、*Per* および *Cry* により構成されるコアループと、これに共役するサブループから成るシステムであるとされている(図 1)。この形式のモデルが発振可能であることは数理解析により示されているが、周期を約 24 時間に調節する機構や位相制御機構など、時計として機能するために重要な性質はモデルから一義的には説明できない。

近年、化合物を利用して様々な生命現象の解明を目指すケミカルバイオロジーが概日時計研究に取り入れられている。申請者もこれまでに 20,000 種類以上の化合物をスクリーニングしたところ、全体の約 1% がリズムの周期や位相に影響を及ぼした。これらのヒット化合物が作用する標的分子を同定できれば概日時計調節機構の理解に大きく貢献できる。一方ケミカルバイオロジーの分野全体において、標的の同定の過程がボトルネックとなっている。現在汎用されている同定法として、アガロースビーズ等の担体に化合物を固定化したプローブを利用した「アフィニティ精製法」が挙げられるが、これが適用できるのは標的と化合物の親和性が比較的高く、細胞抽出液中の標的濃度も十分である場合に限られる。したがって多くの興味深いヒット化合物の中で標的の同定に至るものはごく一部である。また化合物が複数の分子に結合する場合、個々の分子の寄与を明らかにすることは非常に困難である。

### 2. 研究の目的

本研究では、概日時計の周期および位相の調節機構を解明するために、まず概日時計のケミカルバイオロジーに適した新たな標的の同定法を開発する。具体的には、(1) ノックアウトライブラリーを用いた遺伝学的な標的の同定法、(2) 化合物と標的の親和性に基づく標的の同定法細胞透過性プローブを用いた標的の同定法の 2 つを開発し、周期延長および短縮化合物の標的タンパク質を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝学的な標的の同定法については、機能欠損変異体の取得を容易にするためヒト一倍体細胞株 HAP1 にレンチウイルスベクターを用いてゲノムワイド gRNA ノックアウトライブラリーを導入し、Crispr/Cas9 法により 1 遺伝子破壊株のコレクションを作成する予定であったが、HAP1 の核型が不安定であること、および HAP1 の概日リズムが安定して測定できないことから、ヒト二倍体細胞株 hTERT-RPE-1 を用いることとした。この細胞株にノックアウトライブラリーを導入し、標的が未知の概日時計調節化合物を添加した際に、野生株と比較して化合物の効果が減弱、消失、または増強するなど化合物に対する応答性が異なる株をスクリーニングし、原因遺伝子を

同定する。

(2) 化合物と標的の親和性に基づく方法については、当初は概日リズムを短周期化する天然化合物ピクロトキシニンについて細胞透過性プローブを作成する予定であったが、周期短縮活性を保ったまま反応性官能基や標識、触媒部位を化合物に付加することは困難を極めた。そこで、手法としては従来のアフィニティ精製法を用いることとし、より高活性の誘導体を開発することとした。

#### 4. 研究成果

遺伝学的手法による標的の同定については、細胞の培養条件、レンチウイルスベクターによるライブラリーの導入条件等を検討し、ライブラリー由来の gRNA をコードする単一遺伝子が導入されたクローンを単離できるかどうかを確認した 35 mm ディッシュ上でライブラリーを導入し抗生物質でセレクションしたのち、384 ウェルプレートに限界希釈法で播種した。いくつかのクローンをランダムに選び、gRNA 近傍のプライマーを用いて genomic PCR で増幅したところ、gRNA 配列を確認することができた。次に化合物を添加しない条件で、概日時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーター活性リズムをルシフェラーゼレポーターにより測定した。約 3,000 クローンのリズムを測定したところ、そのほとんどがライブラリー導入前と同様の約 22 時間周期のリズムを示した。全体の約 0.5% 程度のクローンにおいては、周期の延長、短縮、振幅の増加、減少など、概日リズムの変化が観察された。今後は化合物の非添加、添加条件でリズムを測定し、化合物に対する応答が野生型と異なる細胞の単離および gRNA 配列の決定を通じての化合物の標的の同定を目指す。

また化合物非添加条件下での測定は、細胞レベルにおける新規概日時計遺伝子の探索と捉えることができる。これまで概日時計遺伝子の探索は、変異原処理を行ったマウスを用いて自発行動リズムを指標に行われてきた。この手法はスループットが低くコストもかかるため、一般的な研究室で実施するのは現実的ではない。本研究の手法を用いることで、新規概日時計遺伝子を同定できる可能性が高まることが期待される。今回のパイロットスクリーニングにより得られたクローンの解析、およびさらなるスクリーニングを実施していく予定である。

化合物と標的の親和性に基づく方法(アフィニティ精製)については、概日リズムの周期を短縮する化合物ピクロトキシニンの特定の部位に様々な官能基を導入した誘導体を合成したところ、約 1,000 倍の高活性を示す化合物が得られた。ピクロトキシニンは 10  $\mu$ M の投与で 1.3 時間、30  $\mu$ M の投与で 3.7 時間の周期短縮が観察されるのに対し、新規誘導体は 10 nM で 3.3 時間、30 nM で 5.4 時間の周期短縮が観察された。今後は新規誘導体を遊離の競合剤として用いたアフィニティ精製を実施するとともに、この誘導体を固定化したアフィニティビーズの作成も検討し、再度アフィニティ精製法に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakayama T, Okimura K, Shen J, Guh YJ, Tamai TK, Shimada A, Minou S, Okushi Y, Shimmura T, Furukawa Y, Kadofusa N, Sato Ayato, Nishimura T, Tanaka M, Nakayama K, Shiina N, Yamamoto N, Loudon AS, Nishiwaki-Ohkawa T, Shinomiya A, Nabeshima T, Nakane Y, Yoshimura T	4. 巻 117
2. 論文標題 Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9594 ~ 9603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000278117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uehara TN, Mizutani Y, Kuwata K, Hirota T, Sato A, Mizoi J, Takao S, Matsuo H, Suzuki T, Ito S, Saito AN, Nishiwaki-Ohkawa T, Yamaguchi-Shinozaki K, Yoshimura T, Kay SA., Itami K, Kinoshita T, Yamaguchi J, Nakamichi N	4. 巻 116
2. 論文標題 Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the Arabidopsis circadian clock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11528 ~ 11536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1903357116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang M, Kobayashi K, Atsumi H, Katada Y, Nakane Y, Chen J, Nagano R, Kadofusa, N, Nishiwaki-Ohkawa T, Kon N, Hirota T, Sato A, Makino T, Yoshimura T	4. 巻 11
2. 論文標題 Modulation of circadian clock by crude drug extracts used in Japanese kampo medicine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00499-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東祐佳、永田晃大、上園悠真、小林茜、桑田啓子、大松亨介、大井貴史、吉村崇、大川妙子
2. 発表標題 概日リズムの周期短縮作用を示す天然化合物の標的同定
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野文菜、石黒将照、伊藤彰啓、武田紗輔、佐藤綾人、中根右介、吉村崇、大川妙子
2. 発表標題 概日リズムの位相を制御する天然化合物の作用機構に関する研究
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田紗輔、中根右介、角房直哉、佐藤綾人、大川妙子、吉村崇
2. 発表標題 概日リズムに影響を与える食品機能性成分の探索
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渥美晴貴、中根右介、角房直哉、佐藤綾人、大川妙子、吉村崇
2. 発表標題 概日リズムを調節する海洋天然物の探索
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Apirada PADLON, Rio HAMASHIMA, Daisuke ONO, Yuko FURUKAWA, Takashi YOSHIMURA, Taeko OHKAWA
2. 発表標題 Levels of constitutively expressed Bmal1 affect the robustness of circadian oscillation
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------