

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05590

研究課題名(和文) 時計タンパク質制御分子の創製と機能解析から概日時計機構に迫る

研究課題名(英文) Development and characterization of small molecules that regulate clock protein function for analysis of the circadian clock mechanism

研究代表者

廣田 毅 (Hirota, Tsuyoshi)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：50372412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計は分子から個体の各階層を時間・空間的に統合して生理現象の日内リズムを生み出す。本研究では概日時計の周期制御に中心的な役割を果たすPERとCRYの安定性および複合体形成に焦点を当て、これらのプロセスを狙った機能調節化合物を探索し、CRY1に選択的に作用する全く新しい化合物を発見した。並行してSUMO化修飾に注目した解析を行い、CRYのSUMO化を見出した。独自のツールを用いて概日時計の発振機構の解明と自在な機能操作を可能にしていく。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock regulates daily rhythms of physiological processes through temporal and spatial organization from molecular to organismal levels. In this study, we focused on stability and complex formation of the clock proteins PER and CRY that play central role in the regulation of circadian period. We searched for regulatory compounds targeting these processes and discovered new compound that selectively control CRY1 function. In parallel, we analyzed post-translational modification of clock proteins by SUMO and identified CRY SUMOylation. By using original tools, we are going to reveal and control the molecular mechanism of the circadian clock.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 時計タンパク質 PER CRY タンパク質分解 タンパク質相互作用 低分子化合物 ケミカルバイオロジー

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠・覚醒や代謝など多様な生理現象は体内に存在する概日時計に支配されて一日周期のリズムを示す。シフトワークや遺伝子変異によって概日時計が攪乱されると睡眠障害や代謝疾患など様々な病気につながる事が知られている。そのため概日時計の分子解析は生物がどのように時間を計って生命活動に利用するのかという根源的な謎に取り組むためだけでなく、概日リズムの変調と諸疾患を時間という観点から理解するためにも非常に重要な課題である。私たちはケミカルバイオロジーという、化合物を用いて生物機構を解析する手法を取り入れて概日時計研究への応用に取り組んできた。これまでに、低分子化合物が特異的で定量的な操作と解析を可能にすることで、概日時計の機能制御過程を研究する重要なツールになることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

それぞれの時計タンパク質は多様な因子と相互作用して時間的・空間的に変化することで機能を発揮すると考えられる。本研究は時計タンパク質 PER と CRY の安定性調節および両者の複合体形成とそれに伴う局在変化に焦点を当てる。これらのプロセスは概日時計の周期調節において特に重要な働きをすることが実験および数理モデル解析から示されているが、制御機構やダイナミクスの詳細はほとんど解明されていない。これらのプロセスに作用する全く新しい化合物の開発を試みる。さらにタンパク質の安定性および細胞内局在を変化させる翻訳後修飾の SUMO 化に注目して PER および CRY の調節を明らかにする。

### 3. 研究の方法

PER1 および PER2 の C 末端にルシフェラーゼを融合したタンパク質である PER1-LUC および PER2-LUC を安定発現する HEK293 細胞を作製した。さらに、PER2 と N 末端側ルシフェラーゼ、および CRY1 と C 末端側ルシフェラーゼを融合したタンパク質である PER2-LUC/N と CRY1-LUC/C の両者を安定発現する HEK293 細胞を作製した。これらの細胞ならびに CRY1-LUC と CRY2-LUC を安定発現する HEK293 細胞をそれぞれ 384 ウェルプレートにまき、化合物を投与して発光量に与える影響を解析した。化合物スクリーニングには名古屋大学の佐藤特任准教授の協力を得た。ルシフェラーゼ自身の活性に対する効果は LUC 細胞を用いて評価した。概日リズムへの影響は *Bmal1-dLuc* および *Per2-dLuc* レポーターをもつヒト U2OS 細胞を用いて解析した。化合物合成には名古屋大学の伊丹教授の協力を得た。

HEK293T 細胞に Flag タグを付加した時計タンパク質を過剰発現させ、名古屋大学の Bode 教授から入手した合成 SUMO プローブ

と混合して *in vitro* SUMO 化を行った。抗 Flag 抗体を用いて精製し、名古屋大学の桑田特任助教の協力を得て質量分析を行った。

### 4. 研究成果

ルシフェラーゼレポーターを用い、PER と CRY の安定性および両者の相互作用を評価するためのアッセイ系を構築した。PER1-LUC および PER2-LUC 細胞において CKI 阻害剤を用いた PER の安定化により、発光強度が増加することを確認した。さらに、PER2-LUC/N と CRY1-LUC/C を共発現する細胞において PER と CRY の結合により、ルシフェラーゼ活性が回復して発光することを確認した。384 ウェルプレートを用い、アッセイ条件を最適化した。

小規模の化合物ライブラリーを解析し、PER2-LUC や CRY1-LUC のレポーター強度を上昇させる、ならびに PER2-LUC/N と CRY1-LUC/C の相互作用レポーターの強度を変化させる候補化合物を見出した。これらの化合物のうちルシフェラーゼ自身の活性には影響を与えないものは、PER2 や CRY1 の安定性もしくは両者の相互作用を調節すると期待された。

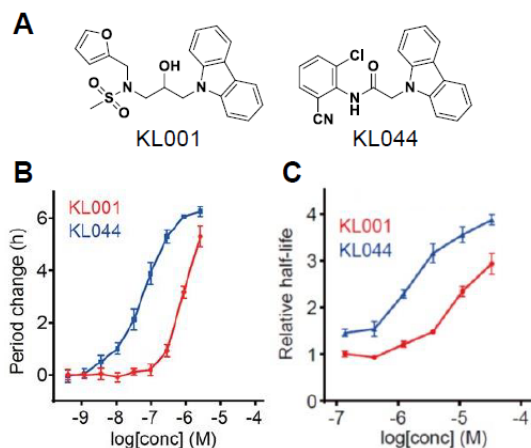


図 1. KL001 の誘導体 KL044

(A) KL001 と KL044 の構造。(B) 概日リズムの周期に対する効果。(C) CRY1 の安定性に対する効果。

続いて化合物スクリーニングを行い、複数の候補化合物を見出した。さらにヒト U2OS 細胞を用いた概日リズムアッセイを行い、時計発振に与える影響を評価した。これらの化合物の機能解析を進めた結果、興味深い作用を持つ新しい化合物を発見した。私たちは以前、CRY1 および CRY2 のユビキチン化を介した分解を抑制し、概日リズムの周期を延長する carbazol 誘導体 KL001 を見出した (Hirota *et al.*, *Science* [2012])。本研究において KL001 類似化合物を解析し、10 倍も活性の高い KL044 (図 1) および周期を短縮する GO044 を見出した (Lee, Hirota *et al.*, *ChemMedChem* [2015]; Oshima *et al.*, *Angew Chem Int Ed*

[2015])。この過程で、carbazol が活性に必須であること、ならびに CRY1 と CRY2 を区別して制御するのは困難であることを明らかにした。一方、今回発見した新化合物は carbazole 基を持たないが、KL001 と同様に概日リズムの周期を延長した。驚くべきことに、この化合物は CRY1 を安定化するのに対して CRY2 には影響を与えないことを見出した (図 2)。

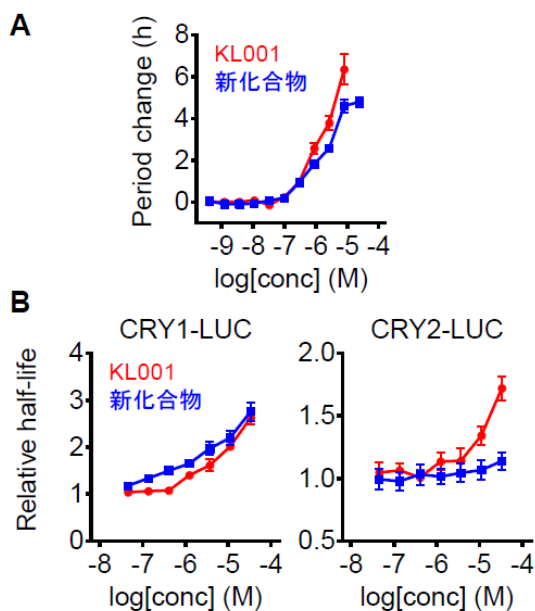


図 2. KL001 と異なる構造を持つ新化合物 (A) 概日リズムの周期に対する効果。(B) CRY1 と CRY2 の安定性に対する効果。

並行して、SUMO プローブを用いて *in vitro* で時計タンパク質を SUMO 化する条件を検討し、SUMO 化型の CRY1 を検出することに成功した。モチーフ検索から SUMO 化候補サイトを予測し、その変異体を多数作製して解析したが、候補サイトを絞り込むことはできなかった。そこで *in vitro* SUMO 化の系をスケールアップし、質量分析を用いて SUMO 化サイトの同定を試みている。

また、核内受容体 REV-ERB $\alpha$  のリン酸化を介した分解制御の役割を米国 Salk 研究所の Evans 研究室と共同で解析した。その結果、REV-ERB $\alpha$  の分解制御が概日リズムの振幅を調節し、肝臓において脂質と糖の代謝に重要であることを明らかにした (Zhao, Hirota *et al.*, *Cell* [2016])。

本研究から、PER および CRY の機能を制御する候補化合物を得ることができた。その中のひとつが CRY1 に選択的に作用することを発見した。CRY1 と CRY2 はアミノ酸配列がたいへんよく似ているため、これらを選択的に制御する分子は非常にユニークであるが、選択性がどのように達成されるのかは全くの謎である。この化合物は CRY1 と CRY2 の機能的な違いを理解するための有用なツールとなるに違いない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Srivastava, A., Hirota, T., Irle, S., and Tama, F.: Conformational dynamics of human protein kinase CK2 $\alpha$  and its effect on function and inhibition. *Proteins*, 86: 344-353 (2018)  
DOI: 10.1002/prot.25444  
査読有
2. Hatori, M., Gronfier, C., Van Gelder, R.N., Bernstein, P.S., Carreras, J., Panda, S., Marks, F., Sliney, D., Hunt, C.E., Hirota, T., Furukawa, T. and Tsubota, K.: Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *NPJ Aging Mech. Dis.*, 3: 9 (2017)  
DOI: 10.1038/s41514-017-0010-2  
査読有
3. Zhao, X., Hirota, T., Han, X., Cho, H., Chong, L., Lamia, K., Liu, S., Atkins, A.R., Banayo, E., Liddle, C., Yu, R.T., Yates III, J.R., Kay, S.A., Downes, M., and Evans, R.M.: Circadian amplitude regulation via FBXW7-targeted REV-ERB $\alpha$  degradation. *Cell*, 165: 1644-1657 (2016)  
DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.012  
査読有
4. Lee, J.W.\*, Hirota, T.\*# (\*, equal contribution; #, correspondence), Kumar, A.\*#, Kim, N.J., Irle, S., and Kay, S.A.#: Development of small molecule Cryptochrome stabilizer derivatives as modulators of the circadian clock. *ChemMedChem*, 10: 1489-1497 (2015)  
DOI: 10.1002/cmde.201500260  
査読有
5. Oshima, T., Yamanaka, I., Kumar, A., Yamaguchi, J., Nishiwaki-Ohkawa, T., Muto, K., Kawamura, R., Hirota, T., Yagita, K., Irle, S., Kay, S.A., Yoshimura, T., and Itami, K.: C-H activation generates period-shortening molecules that target Cryptochrome in the mammalian circadian clock. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54: 7193-7197 (2015)  
DOI: 10.1002/anie.201502942  
査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Aikawa, Y., Kay, S.A., Hirota, T.: Identification of CRY1/CRY2 selective compounds. *12th Annual Salk Institute, Fondation IPSEN, and Science Symposium on Biological Complexity*, La Jolla, USA (2018 年 1 月 22-24 日)
2. 廣田 毅: ケミカルバイオロジーによる 24 時間の創出原理の分子研究. *第24 回日*

- 本時間生物学会学術大会, 京都 (2017 年 10 月 28-29 日)
3. Hirota, T.: Chemical and structural biology approaches to understand molecular mechanism underlying 24-hour period of mammalian circadian clock. **第55回日本生物物理学会年会**, 熊本(2017年9月19-21日)
  4. Hirota, T.: Dissecting design principal of biological clock by using chemical tools. **MANA International Symposium 2017**, Tsukuba, Japan (2017年2月28日-3月3日)
  5. 廣田 毅: 化学と生物学の融合による時間生物学研究. **第23回日本時間生物学会学術大会**, 名古屋(2016年11月12-13日)
  6. Hirota, T.: Chemical regulation of the molecular clock. **The 29th Conference of the International Society for Chronobiology**, Suzhou, China (2016年10月24-28日)
  7. 廣田 毅: 概日時計タンパク質 CRY の FAD 結合ポケットに作用する低分子化合物の発見. **BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会)**, 神戸 (2015年12月1-4日)
  8. 廣田 毅: 哺乳類の概日時計分子のケミカルバイオロジーと構造生物学. **蛋白研セミナー「第6回 神経科学と構造生物学の融合研究会」**, 岡崎 (2015年11月26-27日)
  9. 廣田 毅: Chrono-nutrition 研究における細胞ベースのハイスループットアッセイ. **第22回日本時間生物学会学術大会**, 東京 (2015年11月21-22日)

[図書] (計 1 件)

1. Hirota, T.# (#, correspondence) and Fukada, Y.: Heat shock factors modulate circadian rhythms. **Heat Shock Factor (Nakai, A. ed.)**, Springer, 197-209 (2016)  
DOI: 10.1007/978-4-431-55852-1\_10

[その他]

ホームページ等

1. 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 Kay-廣田グループ  
[http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/kay-hirota\\_group/](http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/kay-hirota_group/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣田 毅 (HIROTA, Tsuyoshi)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：50372412

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

伊丹 健一郎 (ITAMI, Kenichiro)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・教授

Jeffery Bode

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・教授

佐藤 綾人 (SATO, Ayato)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

桑田 啓子 (KUWATA, Keiko)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教