

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19171

研究課題名（和文）概日リズムの振幅制御機構の解明に向けたツール化合物の開発と作用機序解析

研究課題名（英文）Development and characterization of small molecules for analysis of circadian rhythm amplitude

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：概日リズムの振幅は肥満や老化によって減少し、生理機能の調節における重要性が知られているものの、分子レベルの理解が遅れている。本研究は概日リズムの振幅の制御機構にケミカルバイオロジーの手法を用いてアプローチすることを試みた。化合物スクリーニングからリズム振幅を増加させる新規化合物を発見し、作用機序を解析した。さらに研究を進めることにより、振幅制御の理解が深まると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、振幅を増加させる新規化合物を発見した。このようなユニークな化合物が起点となり、将来的には概日リズム疾患の治療への応用に繋がる可能性が期待される。さらに、ケージド longdaysin を開発して光を用いて概日リズム周期を誘導的かつ精密に調節することを世界で初めて実現し、chronopharmacology という新領域を切り拓いた。

研究成果の概要（英文）：Amplitude of the circadian rhythm is reduced by metabolic disease and aging. While circadian amplitude plays an important role in the regulation of physiological outputs, its molecular mechanism is poorly understood. In this study, we tried to approach the molecular mechanism of circadian amplitude regulation by applying chemical biology methods. From chemical screening, we identified new compounds that increase rhythm amplitude and analyzed its mechanism of action. Further study will facilitate the understanding of amplitude regulation.

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 化合物 振幅

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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本質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。遺伝学および分子生物学を中心に概日時計の分子機構の解明が急速に進み、哺乳類においては約 10 種類の時計遺伝子が転写・翻訳のフィードバックループを形成することが判明した。

概日リズムのパラメーターのうち、「周期」と「振幅」はそれぞれ速度と強度を反映する(図1)。周期の解析は概日時計の発振の理解に有効であるのに対し、振幅の解析は概日時計の出力の理解に有効だと考えられる。私たちは概日時計研究においてケミカルバイオロジーの手法を世界に先駆けて応用してきた。周期を変化させる新規化合物を発見し、時計タンパク質 PER および CRY の分解調節が鍵となることを明らかにした(図1)。一方、核内受容体 REV-ERBa の生化学的解析から、この因子のリン酸化を介した分解調節が振幅に影響を与えることを見出した(図1)。

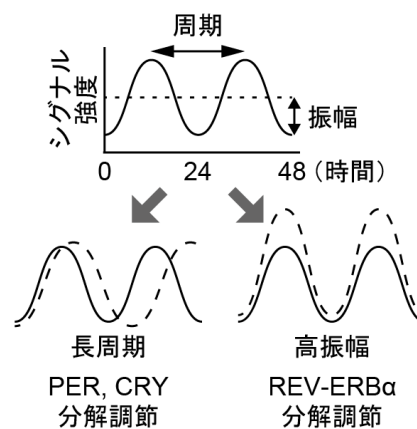


図1. 概日リズムの周期と振幅

2. 研究の目的

概日リズムの振幅は肥満や老化によって減少し、生理機能の調節における重要性が知られているものの、分子レベルの理解が遅れている。私たちは概日時計の周期制御機構の研究においてケミカルバイオロジーの手法が非常に効果的であることを示した。さらに、振幅に注目して小規模の化合物ライブラリーを解析したところ、振幅を大幅に増加させる化合物をいくつか発見することに成功した。そこで本研究は、未開拓分野である振幅の制御機構にケミカルバイオロジーの手法を用いてアプローチすることを試みた。リズムの振幅を顕著に増加させるユニークなツール化合物を発見することで、振幅制御の理解に突破口を開くとともに、肥満や老化の予防と治療に応用する起点としたい。

3. 研究の方法

時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーターにルシフェラーゼを連結したレポーターをもつヒト U2OS 細胞を用い、*Bmal1* の発現リズムを発光変化としてハイスループットに測定する系を応用した。2 万 5 千種類の機能未知化合物をスクリーニングし、レポーターリズムの振幅を 2 倍以上に増加させる「ヒット化合物」を多数見出した。得られた化合物について *Bmal1* および *Per2* の 2 種類のレポーター細胞を用いて効果を確認し、両者において濃度依存的な効果を示す化合物を二次ヒットとした。さらに *in vitro* ルシフェラーゼアッセイを行い、ルシフェラーゼを直接的に活性化する化合物を除外した。

核内受容体の REB-ERB と ROR が振幅を調節することが知られている。本研究は新規の振幅制御機構の解明を目指すことから、REB-ERB/ROR を介した転写制御に与える化合物の影響をレポーターアッセイで解析し、作用しないものに絞り込んだ。残った化合物の中で作用が最も強い化合物について、誘導体の効果を解析し(名古屋大学・伊丹研究室との共同研究)、振幅調節に必要な部位を明らかにした。さらに、化合物の作用解析を行い、標的タンパク質の候補を絞り込んだ。このタンパク質に対する既知の阻害剤ならびに遺伝子ノックダウンがともにルシフェラーゼレポーターリズムの振幅を増加させたことから、見出した化合物はこのタンパク質に対する新規の阻害剤であると考えられる。

以上の研究と並行して、概日リズムの周期延長と振幅増加を引き起こす化合物として以前に見出した longdaysin を用い、ケージド化合物の DK325 と DK359 を開発した(グローニンゲン大学・Feringa 研究室との共同研究; 図2)。これらの化合物は暗条件では活性をもたず、UV または紫色光の照射によって活性化し、標的タンパク質である CKI を *in vitro* で阻害した。

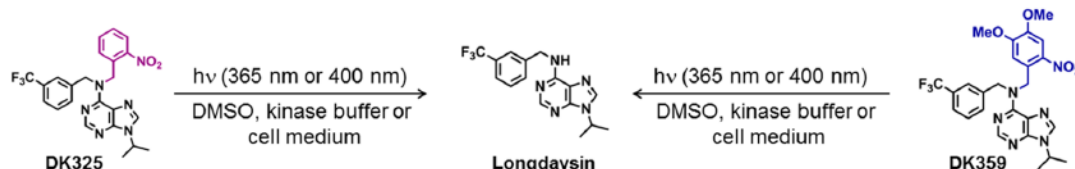


図2. ケージド longdaysin の DK325 および DK359

これらの化合物を用い、光による概日リズムの調節を試みた。*Bmal1* レポーター細胞に様々な濃度の DK325 または DK359 を投与し、0 から 30 分間の UV 光 (図 3A) または紫色光 (図 3B) を照射した後に概日リズムを測定した。その結果、化合物の濃度および光照射の時間に依存して、概日リズムの周期を定量的に調節することに成功した。さらに、化合物を投与して 3 日間に渡ってリズムを測定し、その後に紫色光を照射してさらにリズムを測定した結果、リズム周期を誘導的に調節できることを明らかにした (図 3C)。

Per2 レポーターを持つノックインマウスから脾臓組織を培養し、同様の実験を行った結果、株化細胞だけでなく正常組織においても DK325 と DK359 の濃度および光照射の時間に依存して、概日リズムの周期を定量的に調節できることを示した (図 4)。

4. 研究成果

本研究により、振幅を増加させる新規化合物を発見し、これまでに概日時計への関与が知られていなかった因子を見出すことに成功した。今後、さらに研究を進めることにより、振幅制御の理解が深まると期待できる。このようなユニークな化合物の発見が起点となり、将来的には疾患治療への応用に繋がる可能性を秘めている。

さらに、ケージド longdaysin を用いることにより、光を用いて概日リズム周期を誘導的かつ精密に調節することを世界で初めて実現した。本研究は概日時計機構の解明と疾患治療への応用に向けた「chronophotopharmacology」と呼ぶ新たな領域を生み出すと期待できる (Kolarski, Sugiyama, Breton, Rakers, Ono, Schulte, Tama, Itami, Szymanski, Hirota* (correspondence), and Feringa*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019)。

なお、私たちのこれまでのケミカルバイオロジー研究が国際的に高く評価され、*J. Mol. Biol.* 誌の概日時計特集号に依頼を受けて総説を執筆した (Miller and Hirota*, *J. Mol. Biol.*, 2020)。

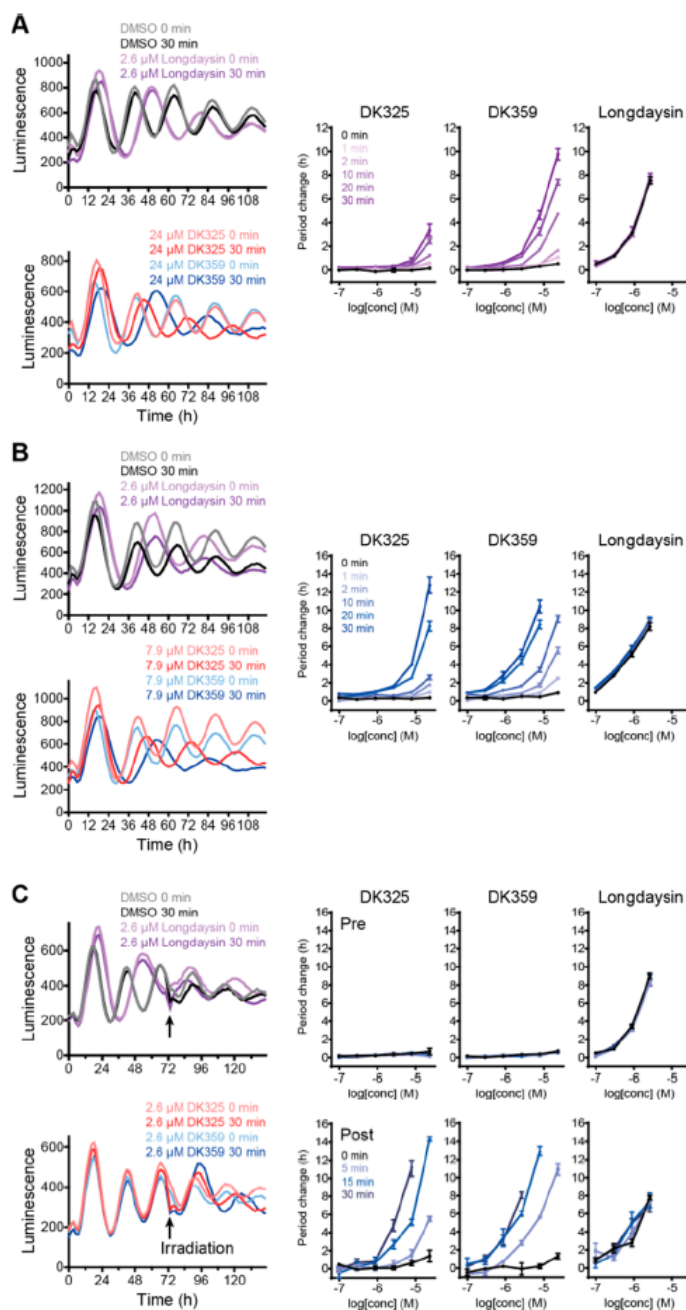


図 3. DK325 および DK359 を用いた *Bmal1* レポーター細胞の概日リズムの調節

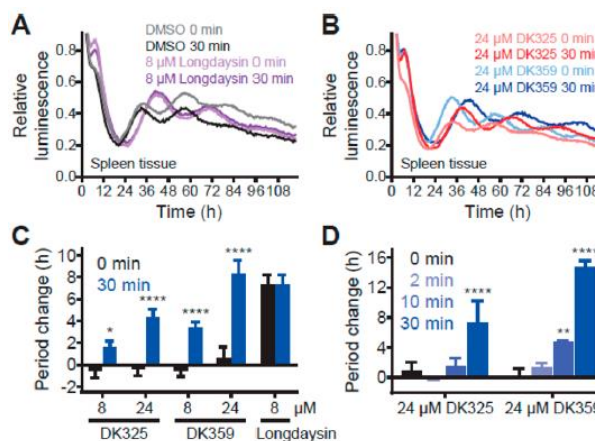


図 4. DK325 および DK359 を用いた培養脾臓組織の概日リズムの調節

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miller Simon, Son You Lee, Aikawa Yoshiki, Makino Eri, Nagai Yoshiko, Srivastava Ashutosh, Oshima Tsuyoshi, Sugiyama Akiko, Hara Aya, Abe Kazuhiro, Hirata Kunio, Oishi Shinya, Hagihara Shinya, Sato Ayato, Tama Florence, Itami Kenichiro, Kay Steve A., Hatori Megumi, Hirota Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0505-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fribourgh Jennifer L, Srivastava Ashutosh, Sandate Colby R, Michael Alicia K, Hsu Peter L, Rakers Christin, Nguyen Leslee T, Torgrimson Megan R, Parico Gian Carlo G, Tripathi Sarvind, Zheng Ning, Lander Gabriel C, Hirota Tsuyoshi, Tama Florence, Partch Carrie L	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamics at the serine loop underlie differential affinity of cryptochromes for CLOCK:BMAL1 to control circadian timing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e55275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55275	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 該当する

1. 著者名 Miller Simon, Hirota Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Pharmacological Interventions to Circadian Clocks and Their Molecular Bases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.01.003	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 Kolarski Dusan, Sugiyama Akiko, Breton Ghislain, Rakers Christin, Ono Daisuke, Schulte Albert, Tama Florence, Itami Kenichiro, Szymanski Wiktor, Hirota Tsuyoshi, Feringa Ben L.	4. 巻 141
2. 論文標題 Controlling the Circadian Clock with High Temporal Resolution through Photodosing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 15784 ~ 15791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b05445	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 該当する

1. 著者名 Mosser Eric A., Chiu Cindy N., Tamai T. Katherine, Hirota Tsuyoshi, Li Suna, Hui May, Wang Amy, Singh Chanpreet, Giovanni Andrew, Kay Steve A., Prober David A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of pathways that regulate circadian rhythms using a larval zebrafish small molecule screen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48914-7	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 該当する

1. 著者名 Zhang Yinfeng, Hirota Tsuyoshi, Kuwata Keiko, Oishi Shunsuke, Gramani Subramanian G., Bode Jeffrey W.	4. 巻 141
2. 論文標題 Chemical Synthesis of Atomically Tailored SUMO E2 Conjugating Enzymes for the Formation of Covalently Linked SUMO ² E2/E3 Ligase Ternary Complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 14742 ~ 14751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b06820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

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 該当する

1. 著者名 Oshima T., Niwa Y., Kuwata K., Srivastava A., Hyoda T., Tsuchiya Y., Kumagai M., Tsuyuguchi M., Tamaru T., Sugiyama A., Ono N., Zolboot N., Aikawa Y., Oishi S., Nonami A., Arai F., Hagihara S., Yamaguchi J., Tama F., Kunisaki Y., Yagita K., Ikeda M., Kinoshita T., Kay S. A., Itami K., Hirota T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau9060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/sciadv.aau9060	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 該当する

1. 著者名 Lee Jae Wook, Hirota Tsuyoshi, Ono Daisuke, Honma Sato, Honma Ken-ichi, Park Keunwan, Kay Steve A.	4. 巻 62
2. 論文標題 Chemical Control of Mammalian Circadian Behavior through Dual Inhibition of Casein Kinase I and	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1989 ~ 1998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Qu Meng, Duffy Tomas, Hirota Tsuyoshi, Kay Steve A.	4. 巻 115
2. 論文標題 Nuclear receptor HNF4A transrepresses CLOCK:BMAL1 and modulates tissue-specific circadian networks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E12305 ~ E12312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1073/pnas.1816411115	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 該当する

1. 著者名 羽鳥 恵、廣田 毅	4. 巻 23
2. 論文標題 時計遺伝子から考える脳機能と食	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FOOD Style21	6. 最初と最後の頁 80-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tsuyoshi Hirota
2. 発表標題 Small molecule modulators of the circadian clock function
3. 学会等名 日本薬理学会 第93回年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 哺乳類CRYタンパク質のアイソフォーム選択的な制御
3. 学会等名 第2回構造生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 概日時計タンパク質を標的とする低分子化合物
3. 学会等名 2019年度BINDS公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Hirota
2. 発表標題 Chemical and structural biology approach for circadian biochemistry of clock proteins
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Hirota
2. 発表標題 Small molecule modulators of mammalian clock proteins
3. 学会等名 2019 CIBR Beijing Conference on Brain & Behavior（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 体内時計を調節する化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 構造生物学とケミカルバイオロジーの融合による概日時計の創薬研究
3. 学会等名 蛋白研セミナー 第1回構造生命科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 新規の概日リズム調節化合物の同定とがん細胞増殖に対する効果
3. 学会等名 第2回がん代謝研究会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirota, T.
2. 発表標題 Dissecting mammalian clock mechanism with chemical tools
3. 学会等名 International Symposium on Biological Rhythms（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣田 毅
2. 発表標題 ケミカルバイオロジーを応用した哺乳類の概日時計のメカニズム解析
3. 学会等名 第3回先端ケミカルバイオロジー研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirota, T.
2. 発表標題 Identification of CRY1/CRY2 selective compounds
3. 学会等名 2018 Society for Research on Biological Rhythm Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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/
--

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