

研究報告書

「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研究」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 廣田 毅

1. 研究のねらい

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。我々はこれまで、ケミカルバイオロジーの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。すなわち、概日時計の機能を調節する新規の化合物を表現型スクリーニングから発見し、その標的タンパク質を同定して作用機序を分子・細胞レベルで解析することにより、哺乳類の概日時計の鍵となる制御機構の一端を明らかにしてきた。

この研究をふまえ、化合物による機能調節メカニズムを原子レベルで解明して精密な制御を実現することが、概日時計システムの理解に必要であると考えた。近年、哺乳類の時計タンパク質の部分構造がX線結晶構造解析によって相次いで報告されているが、機能調節との関連性は殆どが未解明である。本研究では我々が見出したユニークな化合物を用い、生命活動の根底に潜む概日時計機構に構造生物学とケミカルバイオロジーの融合から迫ることを目的とする。具体的には、概日時計の発振に中心的な役割を果たす鍵分子のCRYに焦点をあて、新たな調節化合物がCRYの構造と機能に与える影響を解明する。さらに、CRYに続く候補因子を見出すため、新規の時計調節化合物について標的タンパク質を同定し、時計制御メカニズムの解明を目指す。化合物が標的タンパク質のどこに、どのように作用するのか、どう改変すれば効果をより強く特異的にできるのかといった、従来のアプローチでは限界があった重要な疑問に対して突破口を開く。

2. 研究成果

(1) 概要

我々は以前、CRYを標的とする初の合成化合物KL001を発見した。本研究ではCRYの機能制御を化合物の側から理解するために60種類以上のKL001誘導体を解析し、強力な活性を持つKL044を発見すると共に、Irie研究室(名古屋大学)と共同で作用機構モデルを構築した(論文発表2)。さらに伊丹研究室・吉村研究室(名古屋大学)が開発した、KL001とは逆に概日時計の周期を短縮する誘導体が持つ予想外の作用を解析した(論文発表3)。これらユニークな化合物の作用機序からCRYの制御機構を原子レベルで解明するため、構造生物学研究を立ち上げた。昆虫細胞を用いたCRY1の発現系を阿部博士(名古屋大学・藤吉研究室)の協力を得て確立した。当研究室の相川博士と共同で発現・精製と結晶化を行い、本さきがけ領域の平田研究者(理研播磨)の協力を得てCRY1-KL044複合体の結晶構造を高分解

能で決定することに成功した(その他の成果 3)。さらに、KL001 とは全く異なる化学構造を持ち、CRY に対して大変興味深い作用を示す新規の化合物を用いて複合体の結晶構造を解析することにより、CRY の制御機構の謎に切り込もうとしている。

並行して、概日リズム調節の新たなターゲットを明らかにするため、新規化合物の標的タンパク質の同定を進めている。GO289 と名付けた化合物について伊丹研究室と共同でプローブを開発し、アフィニティー精製と質量分析から CK2 というキナーゼが標的であることを突き止めた。さらに、GO289 が非常に強力かつ選択的に CK2 を阻害することを見出した(特許出願 1、その他の成果 4)。そこで CK2 α -GO289 複合体の結晶構造を木下研究室(大阪府立大学)と共同で決定し、従来の CK2 阻害剤とは異なるユニークな結合様式を明らかにした(その他の成果 2)。より強力で選択的な分子のデザインに向け、Tama 研究室(名古屋大学)と共同で CK2 α の分子動力学解析を行った(論文投稿中)。

さらに、化合物による概日時計の調節を個体レベルに応用することを目指し、ラクオリア創薬株式会社の協力を得て伊丹研究室と共に化合物の最適化を行った(その他の成果 5)。また、Evans 研究室(米国 Salk 研究所)と共同で核内受容体 REV-ERB α のリン酸化を介した分解が概日リズムの振幅を調節することを見出した(論文発表 1)。

(2) 詳細

「KL001 誘導体の機能解析と作用機構モデルの構築」

我々は概日リズムの周期を延長する化合物として KL001 を見出し、時計タンパク質の CRY が標的であることを発見した。さらに、KL001 が CRY の FAD 結合ポケットを介して E3 リガーゼの SCF^{FBXL3} による CRY の分解を抑制することを明らかにした。CRY の機能制御をより深く理解するためには、KL001 のどの部位がいかに活性を調節するのかを知る必要がある。本研究において、60 種類以上の KL001 誘導体の構造活性相関を明らかにし、作用に影響を与える重要な部位とその特性を見出した。この過程で、KL001 よりも 10 倍も強力な活性を持つ KL044 を発見した。これらの結果を基に Irle 研究室(名古屋大学)と共同で定量的構造活性相関解析法を用い、KL001 誘導体の作用機構モデルを構築した。このモデルから誘導体をデザインし、予測に近い活性を得ることに成功した。さらに、KL044 の高い活性は、CRY との強い水素結合と CH- π 相互作用に起因すると予測した(図 1)(論文発表 2)。一方、伊丹研究室・吉村研究室(名古屋大学)は最先端の C-H 活性化を応用してユニークな KL001 誘導体を開発し、興味深いことに KL001 とは逆に概日リズムの周期を短縮する化合物を発見した。KL001 は CRY の分解を抑制して周期を延長することから、その逆に周期を短縮する誘導体は CRY の分解を促進すると予想された。しかし、予想に反して CRY1 の不安定化は観察されず、未知の機能調節メカニズムが示唆された(論文発表 3)。これらの成果はそれぞれ発表誌の表紙を飾り、注目を集めた。

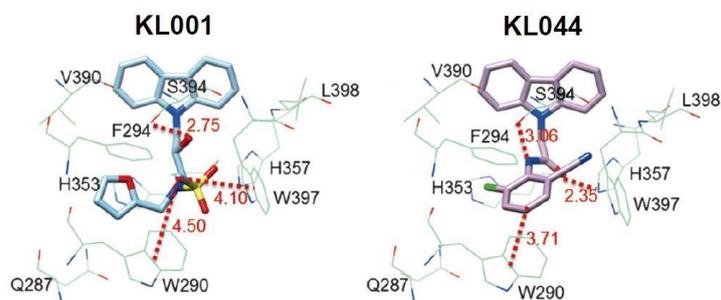


図 1. KL001 と KL044 の CRY1 相互作用モデル

「CRY 調節化合物の構造生物学研究」

我々が見出したユニークな化合物を用いて CRY の制御機構に原子レベルから迫ることを目指し、構造生物学研究を立ち上げた。大腸菌では可溶性の CRY1 を大量に得ることが困難であったことから、昆虫細胞を用いた CRY1 発現系を CREST 構造生命科学の阿部博士(名古屋大学・藤吉研究室)の協力を得て確立した。当研究室の相川博士と共同で発現・精製系のスケールアップを行い、得られたリコンビナント CRY1 を用いて結晶化を行った。さらに、本さきがけ領域の平田研究者(理研播磨)の協力によって X 線回折像を得た。データ解析の結果、アポ型 CRY1 ならびに CRY1-KL044 複合体の結晶構造をそれぞれ 1.6Å と 1.9Å の分解能で決定することに成功した(図2)(その他の成果3)。これらの構造をモデルの結果(図1)

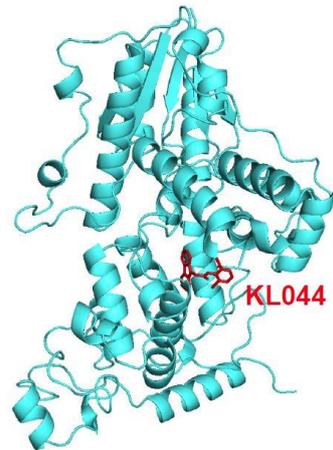


図2. CRY1-KL044 複合体の結晶構造

と比較したところ、リガンド結合ポケットのアミノ酸側鎖は予想以上に大きく動いて KL044 と相互作用することが判明した。CRY1-KL044 複合体の構造は KL001 誘導体の構造活性相関解析の結果をよく反映しており、得られた相互作用様式が溶液中においても成り立つと考えられた。一方、周期を短縮する KL001 誘導体についての結晶化を進め、分解調節と独立した機能制御の分子基盤を解明しようと試みている。さらに、KL001 とは全く異なる化学構造を持ち、CRY に対して大変興味深い作用を示す新規の化合物を見出したことから、この化合物との複合体の結晶構造を解析することで、CRY の制御機構の謎に切り込もうとしている。

「新規の時計調節化合物 GO289 の機能・構造解析」

概日リズム調節の新たなターゲットを明らかにするため、新規の時計調節化合物を用いて標的タンパク質の同定を進めている。そのひとつである GO289 と名付けた化合物は概日リズムの周期を強力に延長する。伊丹研究室と共同で多様な GO289 誘導体が概日リズムに与える作用を解析し、リンカーを取り付けても活性を保つ化合物を開発した。このプローブに相互作用するタンパク質を細胞懸濁液からアフィニティー精製し、質量分析で同定した結果、CK2 というキナーゼを見出した。In vitro キナーゼアッセイにより、GO289 が 7 nM の IC₅₀ で非常に強力に CK2 の活性を抑制すること、ならびに 60 種類の多様なキナーゼのなかで CK2 に対して 1,000 倍以上の高い選択性を持つことを明らかにした(特許出願1、その他の成果4)。GO289 の高い活性と選択性の分子基盤を解明するために、CK2α と GO289 の複合体の結晶構造を木下研究室(大阪府立大学)と共同で解析し、1.68Å の分解能で決定することに成功した(図3)(その他の成果2)。GO289 は CK2α の ATP 結合ポケットに入り込んで強固な水素結合ネットワークを形成していた。さらに、従来の CK2 阻害剤とは異なるユニークな結合様式を見出した。こ

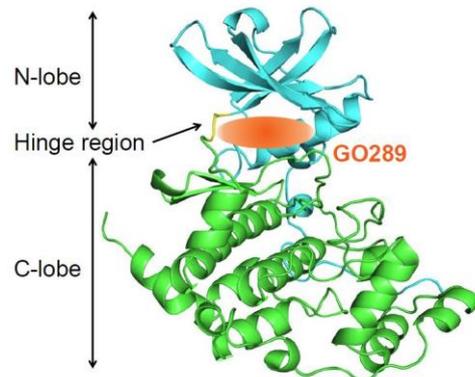


図3. CK2α-GO289 複合体の結晶構造

これらの特徴は GO289 誘導体の活性をよく反映しており、高い活性と選択性の要因になると考えられた。より強力で選択的な分子のデザインに向けて Tama 研究室(名古屋大学)と共同で CK2 α の分子動力学解析を行った結果、溶液中では CK2 α が柔軟に動き、その動態に対して阻害剤が大きく影響することが予測された(論文投稿中)。

「動物実験に向けた時計調節化合物の最適化」

化合物による概日時計の調節を個体レベルに応用することを目指して、ラクオリア創薬株式会社との共同研究により、伊丹研究室と共に GO289 の最適化を行った(その他の成果 5)。創薬の観点から GO289 の新たな誘導体を合成して細胞レベルの概日リズム調節活性を解析し、候補化合物を選出した。さらに *in vitro* での薬物動態を解析し、溶解性と代謝安定性が大幅に向上した化合物を見出すことに成功した。

「核内受容体 REV-ERB α の分解機構による概日リズムの振幅調節」

核内受容体の REV-ERB α は時計遺伝子 *Bmal1* の転写制御を介して概日時計のサブループを形成する。Evans 研究室(米国 Salk 研究所)は CDK1 が REV-ERB α の T275 をリン酸化し、それを E3 リガーゼの SCF^{FBXW7} が認識して分解することを発見した。我々は、この分解制御機構の概日リズム形成における役割を解析した。FBXW7 ならびに CDK1 をノックダウンしたところ、いずれの場合もリズムの振幅が低下することを見出した。さらに、REV-ERB α の T275A 変異体は野生型よりも強く振幅を低下させた。以上の結果から、REV-ERB α のリン酸化を介した分解が概日リズムの振幅を調節することを解明した(論文発表 1)。

以上のように研究計画に沿って順調に研究を進め、概日リズムを調節するユニークな化合物の機能と構造の解析を組み合わせ、制御メカニズムを明らかにした。責任著者として 1 報、共著者として 2 報の論文を発表し、未発表の結果についても近日中に論文にまとめる予定である。概日時計の分子機構に関する知見をどのようにヒトの健康増進に役立てていくのかは本研究分野における最重要課題のひとつであり、創薬企業との共同研究によってこの課題にも着手した。

3. 今後の展開

概日時計システムは分子・細胞・組織・個体を時間的および空間的に統合し、個体の行動変化を分子レベルから説明できる非常にユニークな系である。本研究において時計タンパク質 CRY に強力に作用する化合物 KL044 を見出し、CRY1-KL044 複合体の結晶構造を決定したことにより、化合物による機能制御の理解を深めることができた。一方、周期を短縮する誘導体については作用機序がわかっておらず、CRY との複合体の構造決定が急務である。今後、新規の CRY 調節化合物を用いた構造解析とあわせ、新たな制御機構が明らかとなるに違いない。時計調節化合物 GO289 の標的タンパク質の同定からは、この化合物が非常に強力で選択的な CK2 阻害剤であることが判明し、その分子基盤が CK2 α -GO289 複合体の構造解析から明らかになった。今後は CRY や CK2 の構造情報に基づいた分子デザインが進展すると期待できる。化合物のダイナミックな作用を理解するために分子動態を解析していくことも必要である。さらに、新規化合物の標的の同定を継続することにより、これまで特異的な化合物が

知られていなかった時計タンパク質や時計機構に関与することが知られていなかった時計タンパク質候補に対する調節化合物の発見と、それに基づく制御機構の解明が期待できる。時計調節化合物に関する我々の総説(その他の成果 1)が 2017 年ノーベル生理学・医学賞の Scientific Background で引用されたように、概日時計の分子機構に関する知見を社会実装していくことが重要であり、時計機構をターゲットとした医薬品の創出を目指す研究が進展すると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

私は本さがけ研究と共に初めて構造生物学研究を開始した。CRY1 タンパク質の発見・精製は想定外に難しく苦労したものの、本さがけ領域の研究者やアドバイザーならびに多くの共同研究者のおかげで、ユニークな化合物との複合体の結晶構造を決定することに成功した。未発表のデータを含めると研究目的の大部分を達成し、CRY の機能制御機構に関して予想外の重要な知見が得られている。新規の時計調節化合物についても、標的タンパク質として CK2 を見出すことに成功し、複合体の結晶構造を共同研究によって決定した。研究目的を超える成果としてさらに、創薬企業との共同研究を開始して個体レベルへと研究を展開しようとしている。未発表ではあるが、CREST・さがけ構造生命科学領域のネットワークを活用して新たな研究テーマを開始し、領域内の共同研究によって時計タンパク質の機能調節研究に新展開が生まれようとしている。以上のように、独自の機能調節化合物を軸にさがけ領域内外の研究者との共同研究を強力に推進し、ケミカルバイオロジーと構造生物学の融合を通じて「構造生命科学」の発展に資する研究を行ってきた。2014 年 5 月にアメリカから着任して新しい研究室をスタートさせたところであり、研究費を有効に活用して機器や試薬を揃えらると共にパートタイム技術補佐員 3 名を雇用することで、環境を整えて研究を軌道にのせることができた。本研究の成果が認められて国内外の招待講演が増えるなど、研究者としての飛躍につながった。概日リズムに対する社会的な関心が高まる中、世界トップレベルの概日時計ケミカルバイオロジー研究を継続し、領域を牽引していきたい。本研究の成果ならびに SciFoS 活動で得た経験を基に、独創的な化合物を用いて概日時計の分子機構の理解ならびに「世界初の概日リズム調節薬」の開発に貢献していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

分子生物学、細胞生物学が主な手法であった時間生物学に、ケミカルバイオロジーと構造生物学で切り込み、見事に CRY の低分子化合物による制御機構、CRY1, 2 の使い分け、新たな概日周期タンパク質 CK2 の発見など、通常的手法では発見できない成果を次々と上げた。非常に多くの研究者と有機的な共同研究を結び、大きな成果につなげている。基礎研究だけでなく、社会還元のため、素晴らしい行動力で企業や VC の調査も行い、がん治療への応用にも積極的に取り組んでいることは高く評価される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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 α degradation. *Cell* (2016) 165: 1644-1657
2. Lee, J.W.*, **Hirota, T.*#** (*, co-first author; #, 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* (2015) 10: 1489-1497 [Cover article]
3. 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.* (2015) 54: 7193-7197 [Cover article]

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: Tsuyoshi Hirota, Steve Kay, Kenichiro Itami, Tsuyoshi Oshima, Junichiro Yamaguchi

発明の名称: Compound having circadian rhythm modulatory activity by targeting CK2

出 願 人: Nagoya University, University of California

出 願 日: 2016/6/3

出 願 番 号: USPTO 62/345,459

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 【英文総説】 **Hirota, T.** and Kay, S.A.: Identification of small-molecule modulators of the circadian clock. *Methods Enzymol.* (2015) 551: 267-282
2. 【国際学会・招待講演】 **Hirota, T.**: Chemical regulation of the molecular clock. *The 29th Conference of the International Society for Chronobiology* シンポジウム (2016/10) Suzhou, China
3. 【国内学会・招待講演】 **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* シンポジウム (2017/9) 熊本
4. 【その他の講演】 **廣田 毅**: タンパク質キナーゼ CK2 の新規阻害剤の開発と概日リズムの調節. *JST 新技術説明会* (2017/2) 東京
5. 【プレスリリース】 ラクオリア創薬株式会社と名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の共同研究開始のお知らせ ~体内時計のリズムを調節する新薬の創出を目指して~ (2015/11/18) http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/news/20151118_RaQualia-ITbM_JP_PressRelease.pdf

以上の他に	
英文総説	2 件
国際学会・招待講演	1 件
国内学会・招待講演	6 件
その他の講演	4 件