

220 概日時計によるがん細胞増殖制御の分子機構	廣田 毅
--------------------------	------

**【目的】** 睡眠・覚醒や代謝など、様々な生理現象は一日周期のリズムを示す。これらのリズムを支配するのが、体内に存在する概日時計である。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、睡眠障害やがん、代謝疾患などの多様な病気につながる。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が今後の重要課題である。私たちは、時計タンパク質の直接かつ定量的な機能操作を可能にする「時計調節化合物」を多数発見し、GO289 と名付けた時計調節化合物がタンパク質キナーゼ CK2 を標的として、腎細胞がんの細胞株および急性骨髄性白血病モデル細胞の増殖を細胞種に依存して抑制することを見出した。本研究では新規の時計調節化合物の作用メカニズムを解明し、これを用いてがん細胞の増殖を制御することを目的とした。

**【方法】** 時計調節化合物が CRY1 と CRY2 の半減期に与える影響を、ルシフェラーゼとの融合タンパク質を発現する細胞を用いた分解アッセイによって解析した。同様に、CRY の変異が化合物の効果に与える影響を分解アッセイによって解析した。CRY と化合物の相互作用を熱シフトアッセイによって解析した。化合物の作用における CRY アイソフォームの役割を、*Per2* ルシフェラーゼレポーターをノックインしたマウス (Wild type、*Cry1* KO、*Cry2* KO、*Cry1/Cry2* KO) の線維芽細胞を用いて解析した。CRY の変異が化合物の効果に与える影響を、*Cry1/Cry2* KO マウスの線維芽細胞に *Bmal1* ルシフェラーゼレポーターと *Cry1* または *Cry2* 発現ベクターをトランスフェクションして解析した。

**【結果】** CK2 に加えて、時計タンパク質の CRY はがん細胞増殖制御の有望なターゲットである。すなわち、私たちが発見した KL001 という CRY に作用する化合物やその誘導体である SHP656 が、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ幹細胞の増殖を抑制することが報告された。CRY には CRY1 と CRY2 というふたつのアイソフォームが存在し、それぞれに選択的に作用する化合物は各アイソフォームの機能解明に大きく役立つに違いない。しかし、CRY1 と CRY2 の化合物結合ポケットは高度に保存されており、KL001 は両者に作用することから、アイソフォーム選択的な化合物のデザインは困難であった。標的未知の時計調節化合物の解析から、CRY1 に選択的に作用する KL101、KL201、TH303 と TH129、および CRY2 に選択的な TH301 を発見した。化合物結合ポケットのアミノ酸は CRY1 と CRY2 の間で同一であるものの、「ゲートキーパー」と名付けたトリプトファン残基の向きがアイソフォーム間で異なることを見出した。この向きを変化させるような変異体では KL101 と TH301 に対する応答が逆転したことから、ゲートキーパーの向きが化合物の選択性を生み出すと考えられた。一方、SHP656 は KL001 の誘導体であることから、CRY1 と CRY2 の両方に作用すると予想された。しかし解析の結果、興味深いことに SHP656 が CRY2 選択性を示すこと、およびこの選択性にもゲートキーパーが関与することを見出した。さらに、SHP656 の R 体が活性型であることを見出し、グリオブラストーマ幹細胞の増殖を抑制することを明らかにした。以上の結果から、CRY2 が概日時計を介したグリオブラストーマ幹細胞増殖制御のターゲットとなることを明らかにし、それを制御するユニークな化合物を見出すとともに作用メカニズムを解明することに成功した。

概日時計タンパク質の CRY に作用する化合物

