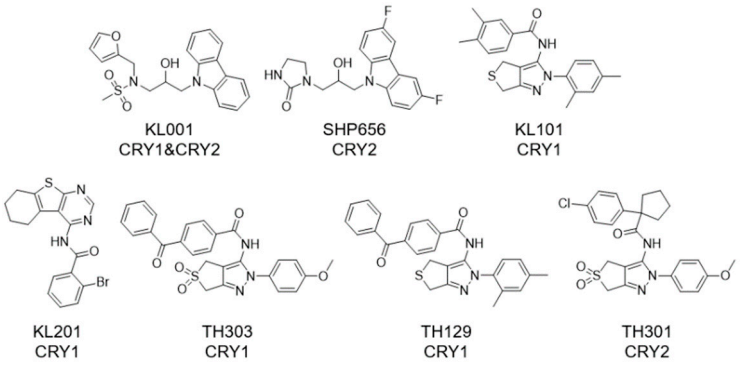
220　概日時計によるがん細胞増殖制御の分子機構	廣田　毅

【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



220. 概日時計によるがん細胞増殖制御の分子機構

廣田　毅

名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所

Key words：概日時計，がん細胞増殖，低分子化合物，CK2，CRY

緒　言

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。私たちは、概日時計が一日の周期で発振する分子機構を解明する目的で、ケミカルバイオロジーに注目して研究を進めてきた（[1，2] に総説）。細胞を用いた表現型スクリーニング系をセットアップし、70 万種類を超える合成化合物から、概日周期に影響を与える「時計調節化合物」を多数発見した。これらの新規化合物がどのようなタンパク質にいかなる作用を示すのかを分子・細胞さらに原子レベルで解析することにより、概日時計の鍵となる制御機構を明らかにした。これまでに、時計調節化合物の標的タンパク質として時計タンパク質の CRY およびタンパク質キナーゼの CK I と CK2 を発見した。これら独自の時計調節化合物は、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。

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。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。ヒトの疫学研究および時計遺伝子の変異マウスを用いた解析から、概日時計とがんとの関係が明らかになってきた。すなわち、概日時計は細胞増殖に影響を与え、時計機能に異常が生じると多様ながんのリスクが高まる。私たちは 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、その活性を極めて強力かつ特異的に阻害することを発見した。CK2 は概日時計だけでなく細胞周期や細胞死を調節することから、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を用いて GO289 の効果を解析したところ、細胞種に依存して増殖抑制効果を示すことを見出した［3］。以上の背景に基づき、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

1. CRY 分解アッセイ

CRY1 または CRY2 とルシフェラーゼの融合タンパク質を発現する HEK293 細胞を用い、半減期に与える時計調節化合物の効果を発光測定によって解析した。同様に、CRY の変異体とルシフェラーゼの融合タンパク質を HEK293T 細胞に一過的に発現させ、KL101 と TH301 の効果を解析した。

2. 熱シフトアッセイ

リコンビナントの CRY1 または CRY2 タンパク質（PHR ドメイン）を用い、熱変性温度に対する KL001 および SHP656 の効果を解析することで、CRY と化合物の相互作用を評価した。

3. *Per2* レポーター抑制アッセイ

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、KL001 および SHP656 の効果を発光測定によって解析した。

4. *Cry* KO レスキューアッセイ

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、SHP656 の効果を発光リズム測定によって解析した。

結果および考察

1. CRY アイソフォーム選択的な化合物の発見と分子機構の解明

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［4］やその誘導体である SHP656（図 1）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 というふたつのよく似たアイソフォームが存在する。両者はリダンダントに働くと考えられていたが、近年の報告から、互いに異なる役割も持つことが明らかになった。そのため、CRY1 と CRY2 の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。私たちは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［5～7］（図 1）。

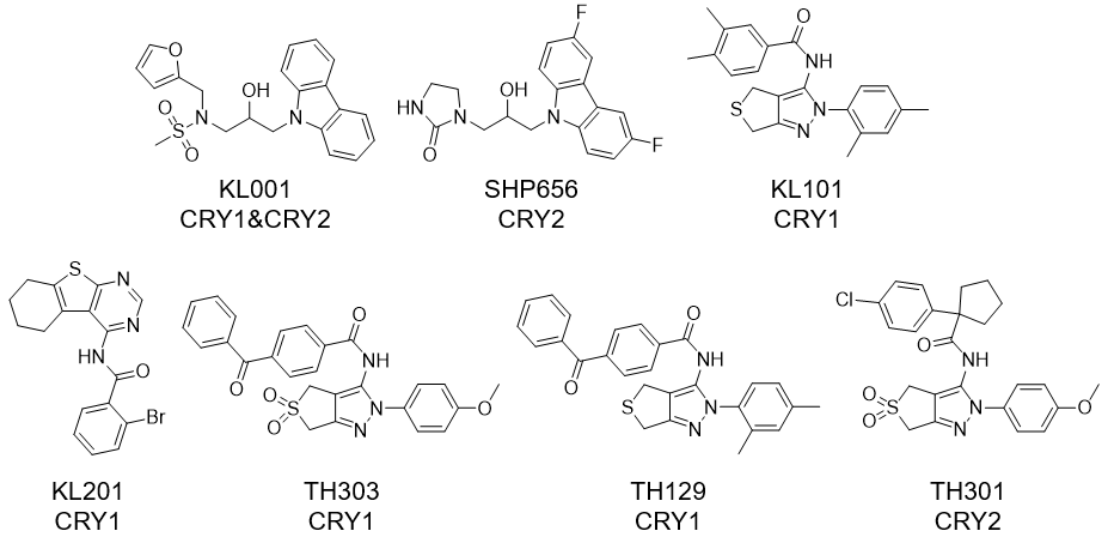


図 1. CRY に作用する化合物

構造とともに化合物名および標的となる CRY アイソフォームを示した。

これらの化合物は CRY を介したがん増殖制御の有用なツールになると考えられるが、どのようにしてアイソフォーム選択的に働くのかは不明であった。そこで化合物が結合していない状態の CRY1 と CRY2 の結晶構造を決定し［8］、化合物が結合した状態の構造［5～7］と比較した。その結果、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（CRY1 W399 および CRY2 W417）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（CRY1 Q407A および CRY2 F423A／F424A）では KL101 と TH301 に対する応答が逆転したことから（図 2）、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［8］。

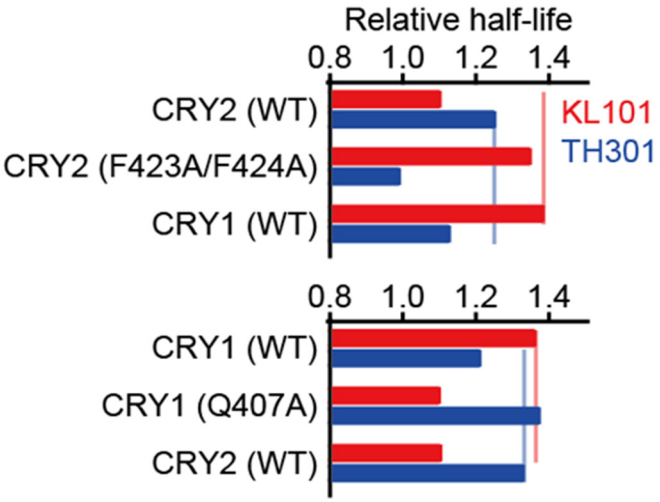


図 2. CRY の変異が KL101 と TH301 のアイソフォーム選択性に与える影響
CRY タンパク質の半減期の変化を、DMSO コントロールを 1 として示した。KL101 と TH301 はそれぞれ CRY1 と CRY2 を選択的に安定化した。CRY2 F423A/F424A および CRY1 Q407A 変異体では選択性が逆転した。

2. SHP656 の CRY アイソフォーム選択性の解明とグリオブラストーマ幹細胞の増殖抑制

SHP656（図 1）は *in vivo* においてグリオブラストーマ幹細胞の増殖を抑制するものの、CRY アイソフォームの選択性は不明であった。概日時計を介した増殖制御の理解に向けて、どの CRY アイソフォームが関与するのかを解明することが重要である。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 CRY2 に選択性を示すことを見出した。すなわち、SHP656 は CRY1 よりも CRY2 に強く相互作用し（図 3a）、SHP656 による *Per2* レポーター抑制効果が *Cry2* のノックアウトによって低下した（図 3b）。CRY2 と SHP656 の複合体の結晶構造解析から、SHP656 の選択性にもゲートキーパーが関与することが示唆された。実際、ゲートキーパーの向きを変える CRY2 F423A／F424A 変異体では SHP656 に対する応答が低下した（図 4）。さらに、SHP656 はラセミ混合物であるが、結晶構造では *R* 体が CRY2 と相互作用していた。*R* 体のみを合成して解析した結果、SHP656 よりも高い活性を示し、活性型であることを見出した。その上、*R* 体が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。

3. おわりに

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。今後、これらの化合物を用いて多様ながん細胞に対する効果の解析ならびに増殖抑制のメカニズム解明を進めたい。時計タンパク質は全身の細胞に発現していることから、時間・空間的に限定した機能操作が重要になると考えられる。私たちは光薬理学を応用して、時計調節化合物の活性を光によって可逆的に変化させることにも取り組んでいる［7，9，10］。将来的には、この手法を用いてがん組織特異的な時空間制御に挑戦したい。概日時計とがんの分子的な連関を理解し、時計機構に基づいてがんを制御するための起点を築いていく。

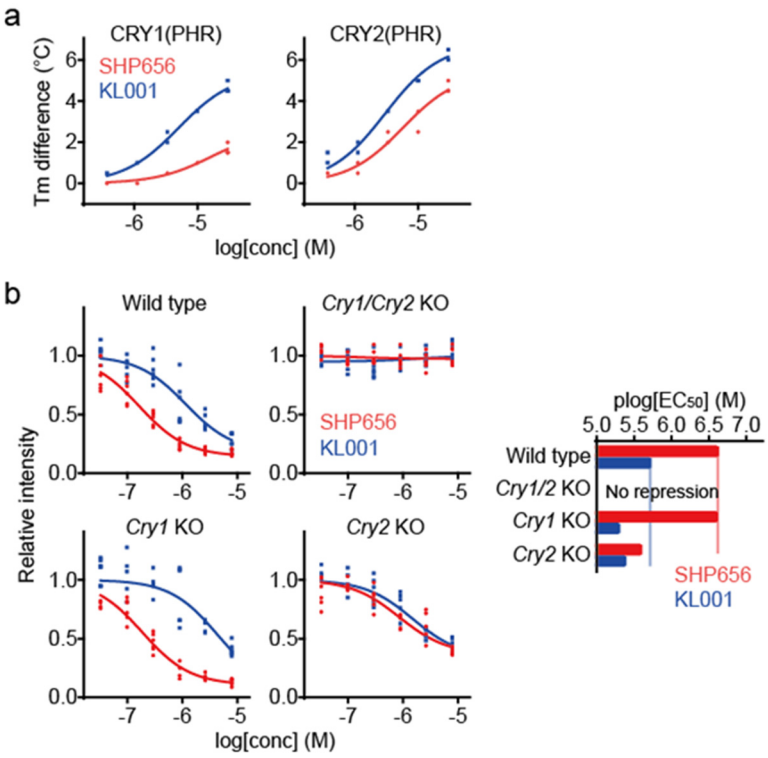


図 3. SHP656 の CRY2 選択的な作用

a) CRY と化合物の相互作用。リコンビナント CRY タンパク質（PHR ドメイン）の熱変性温度の変化を、DMSO コントロールを 0 として示した。横軸は化合物の濃度。KL001 は CRY1 と CRY2 の両者を安定化したのに対し、SHP656 は CRY2 選択性を示した。

b) 化合物の効果に対する *Cry* ノックアウトの影響。*Per2* レポーター抑制活性の変化を、DMSO コントロールを 1 として示した。横軸は化合物の濃度。50%抑制に必要な化合物濃度を右パネルにまとめた。KL001 の効果は *Cry1* と *Cry2* のノックアウトそれぞれによって低下したのに対し、SHP656 の効果は *Cry2* ノックアウトのみで低下した。

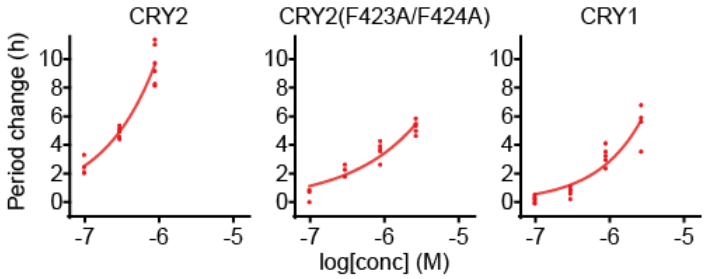


図 4. CRY の変異が SHP656 の効果に与える影響

概日リズムの周期延長活性の変化を、DMSO コントロールを 0 として示した。横軸は化合物の濃度。SHP656 は CRY1 よりも CRY2 に強く作用した。CRY2 F423A/F424A 変異体では効果が CRY1 程度まで低下した。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に当たり、南カリフォルニア大学医学部の Steve Kay 博士の協力、ならびに上原記念生命科学財団からのご支援に心より感謝いたします。

文　献

1) Miller S, Hirota T*. Pharmacological Interventions to Circadian Clocks and Their Molecular Bases. J Mol Biol. 2020 May 29;432(12):3498-3514. Epub 2020 Jan 10. PMID: 31931005 DOI: 10.1016/j.jmb.2020.01.003

2) Miller S, Hirota T*. Structural and Chemical Biology Approaches Reveal Isoform-Selective Mechanisms of Ligand Interactions in Mammalian Cryptochromes. Front Physiol. 2022 Jan 28;13:837280. eCollection 2022. PMID: 35153842 DOI: 10.3389/fphys.2022.837280

3) 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 SA, Itami K*, Hirota T*. Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth. Sci Adv. 2019 Jan 23;5(1):eaau9060. eCollection 2019 Jan. PMID: 30746467 DOI: 10.1126/sciadv.aau9060

4) Hirota T, Lee JW, St John PC, Sawa M, Iwaisako K, Noguchi T, Pongsawakul PY, Sonntag T, Welsh DK, Brenner DA, Doyle FJ 3rd, Schultz PG*, Kay SA*. Identification of small molecule activators of cryptochrome. Science. 2012 Aug 31;337(6098):1094-7. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22798407 DOI: 10.1126/science.1223710

5) Miller S, Son YL, Aikawa Y, Makino E, Nagai Y, Srivastava A, Oshima T, Sugiyama A, Hara A, Abe K, Hirata K, Oishi S, Hagihara S, Sato A, Tama F, Itami K, Kay SA, Hatori M*, Hirota T*. Isoform-selective regulation of mammalian cryptochromes. Nat Chem Biol. 2020 Jun;16(6):676-685. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32231341 DOI: 10.1038/s41589-020-0505-1

6) Miller S, Aikawa Y, Sugiyama A, Nagai Y, Hara A, Oshima T, Amaike K, Kay SA, Itami K, Hirota T*. An Isoform-Selective Modulator of Cryptochrome 1 Regulates Circadian Rhythms in Mammals. Cell Chem Biol. 2020 Sep 17;27(9):1192-1198.e5. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32502390 DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.05.008

7) Kolarski D, Miller S, Oshima T, Nagai Y, Aoki Y, Kobauri P, Srivastava A, Sugiyama A, Amaike K, Sato A, Tama F, Szymanski W, Feringa BL*, Itami K*, Hirota T*. Photopharmacological Manipulation of Mammalian CRY1 for Regulation of the Circadian Clock. J Am Chem Soc. 2021 Feb 3;143(4):2078-2087. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33464888 DOI: 10.1021/jacs.0c12280

8) Miller S, Srivastava A, Nagai Y, Aikawa Y, Tama F, Hirota T*. Structural differences in the FAD-binding pockets and lid loops of mammalian CRY1 and CRY2 for isoform-selective regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jun 29;118(26):e2026191118. PMID: 34172584 DOI: 10.1073/pnas.2026191118

9) Kolarski D, Sugiyama A, Rodat T, Schulte A, Peifer C, Itami K, Hirota T*, Feringa BL*, Szymanski W*. Reductive stability evaluation of 6-azopurine photoswitches for the regulation of CKIα activity and circadian rhythms. Org Biomol Chem. 2021 Mar 18;19(10):2312-2321. PMID: 33634812 DOI: 10.1039/d1ob00014d

10) Kolarski D, Miró-Vinyals C, Sugiyama A, Srivastava A, Ono D, Nagai Y, Iida M, Itami K, Tama F, Szymanski W*, Hirota T*, Feringa BL*. Reversible modulation of circadian time with chronophotopharmacology. Nat Commun. 2021 May 26;12(1):3164. PMID: 34039965 DOI: 10.1038/s41467-021-23301-x