

概日リズム制御タンパク質 BMAL1 の *in vivo* インタラクトーム解析

三村 明日香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 杉山 文博 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

多くの生物は環境の変化に適応するため、概日リズムという約 24 時間周期で生理現象を変動させる仕組みを持つ。概日リズムは各細胞に存在する時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループにより形成され、光刺激を受容する視交叉上核の働きにより全身のリズムが調律されている。このループでは転写因子 BMAL1 が核内で CLOCK と複合体を形成し、自らの活性を抑制する因子 (PER, CRY) の転写を促進することで概日リズムの波を生み出す。この BMAL1/CLOCK 複合体は様々な時計制御下遺伝子 (clock controlled gene; CCG) の転写も促進するため、CCG もリズムカルな遺伝子発現を示す。BMAL1/CLOCK を中心としたループが各細胞に存在する一方で、一部の CCG は組織特異的に発現する。この組織特異的な CCG の発現制御には BMAL1 以外の転写調節因子の関与が必要と考えられるが、各組織における BMAL1 の相互作用因子の違いは不明である。そこで本研究では、*in vivo* において BMAL1 相互作用タンパク質の網羅的解析を行い、組織特異的な BMAL1 相互作用因子の同定を目指す。

相互作用タンパク質の網羅的解析には、近位依存性ビオチン標識 (BioID) を利用する。本研究では BMAL1 に大腸菌由来ビオチンリガーゼ BirA* を融合させ、BMAL1 の近位に存在するタンパク質を不可逆的にビオチン標識する。ビオチン化タンパク質はアビジンをを用いた精製の後に、質量分析によるタンパク質同定が可能である。BioID は弱いタンパク質間相互作用や、一時的な結合因子も検出できるため、新規の相互作用因子の発見が期待される。本研究では BMAL1-BirA*-HA tag (BMAL1-BioID) を発現するノックイン (KI) マウスを用い、BMAL1-BioID のビオチン化能の評価を行った。

【材料・方法】

○ 使用したマウス

CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス ROSA26 遺伝子座に、[CAG promoter-loxP-EGFP-polyA-loxP-BMAL1-BioID-polyA] の配列を相同組換えにより KI した (コントロールマウス)。このマウスの受精卵に Cre mRNA をエレクトロポレーションすることで EGFP-polyA を除き、BMAL1-BioID を全身で発現する BMAL1-BioID KI マウスを作製した。(図 1)

○ *in vivo* における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

2 ヶ月齢の BMAL1-BioID KI マウス に 1 日 1 回、ビオチン (19.2 mg/kg) を 7 日間皮下投与した後、脳、心臓、腎臓、肝臓からタンパク質を抽出し、Streptavidin-HRP (SA-HRP) を用いたウェスタンブロット解析により、ビオチン化タンパク質を検出した。

○ MEFs における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

胎生 14.5 日目の BMAL1-BioID KI マウスから線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblasts; MEFs) を作製し、ビオチン非添加、または添加 (終濃度 50 μM) の条件下で 24 時間培養後、タンパク質を抽出し SA-HRP、Anti-BMAL1 抗体、Anti-GAPDH 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【結果】

○ *in vivo* における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

ウェスタンブロット解析の結果、BMAL1-BioID KI マウスの検査した組織の全てで、BMAL1-BioID タンパク質の発現を確認した。しかしビオチン投与後のそれら組織において、コントロールマウスと比較して、BMAL1-BioID KI マウスにおけるビオチン化タンパク質の蓄積は認められなかった。(data not shown)

○ MEFs における BMAL1-BioID のビオチン化能の評価

マウス個体においてビオチン化が認められなかったことから、初代培養系を用いて、BMAL1-BioID のビオチン化能の評価を行った。野生型 MEFs では、ビオチン添加によるビオチン化タンパク質の変化は認められなかった。一方で、BMAL1-BioID KI MEFs は BMAL1-BioID を発現しており、ビオチン添加によりビオチン化タンパク質の蓄積が認められた。(図 2)

【考察・展望】

BMAL1-BioID KI MEFs において、ビオチン添加によるビオチン化タンパク質の増加が認められたことから、KI した BMAL1-BioID はビオチン化能を有すると考えられる。しかし、24 時間のビオチン処理にも関わらず、ビオチン化の程度が弱いことから (図 2)、*in vivo* BioID assay では BMAL1-BioID のビオチン化能が不十分であると予想される。

in vivo における ID assay を可能とするには、ビオチン化効率の優れたビオチン化酵素の使用や、ビオチン投与における手法の改善が必要であると考えられる。

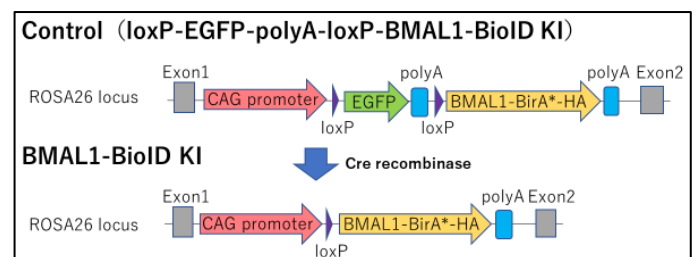


図 1. KI マウスの概略

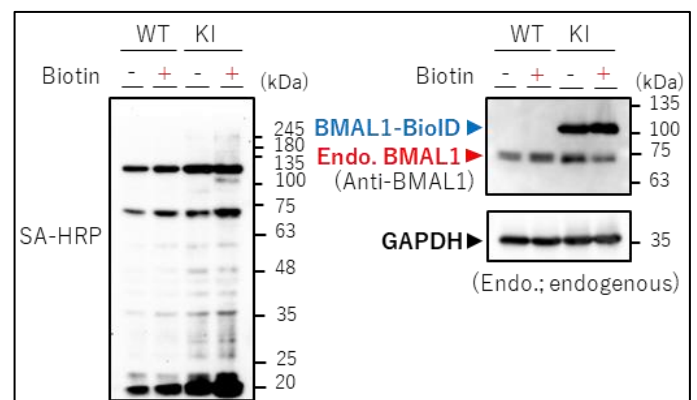


図 2. BMAL1-BioID KI MEFs のウェスタンブロット解析