

一般演題抄録

I-1 Carbonyl reductase 1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製および解析

○横山美奈子¹ 藤田敏次² 門ノ沢結花¹ 多田羅洋太³ 藤井穂高²
横山良仁¹
(弘前大学大学院医学研究科 産科婦人科学講座¹ 同 ゲノム生化学講座² 同 分子生体防御学講座³)

【緒言】Carbonyl reductase 1 (CBR1) は、幅広い基質特異性を有するニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸依存性の還元酵素である。発がん、アポトーシス、シグナル伝達、薬剤耐性など、様々な細胞内プロセスに関与している。本研究では、CBR1の生理的意義を解明する一助として、mouse Cbr1 (mCbr1) を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、mCbr1の過剰発現に伴う蛋白質の発現変動を質量分析で解析した。

【方法】3xFLAG タグ付き mCbr1 (3xFLAG-mCbr1) を CAG プロモーター制御下で過剰発現する Tg マウスを作製した。染色体上に挿入された 3xFLAG-mCbr1 のコピー数を real-time PCR で評価し、挿入部位は next-generation sequencing (NGS) で解析した。主要臓器の mCbr1 の mRNA および蛋白質の発現量は real-time PCR および Western Blotting (WB) で評価した。mCbr1 は心臓で過剰発現していたため、抗 CBR1 抗体を用いて心臓組織標本の免疫染色を行い、過剰発現を確認した。さらに、心臓の蛋白質の質量分析を行い、ingenuity pathway analysis (IPA) でパスウェイ解析およびネットワーク解析を行った。

【結果】C57BL/6N マウスの受精卵に 3xFLAG-mCbr1 遺伝子を導入したところ、最終的に Tg7 および Tg15 の 2 系統の Tg マウスが継代可能であった。Real-time PCR で 3xFLAG-mCbr1 遺伝子のコピー数を評価したところ Tg7 は 3xFLAG-mCbr1 が 1 コピー、Tg15 は 2~3 コピーが挿入されていると推測された。また NGS 解析の結果、Tg7 は 4 番染色体に、Tg15 は X 染色体に 3xFLAG-mCbr1 が挿入されていることが判明した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、子宮、卵巣の 8 臓器における 3xFLAG-mCbr1 mRNA の発現量を real-time PCR および WB で評価したところ、Tg7 は心臓に過剰発現し、Tg15 は心臓に加え、脳、肺、腎臓、子宮、卵巣でも過剰発現していた。WT、Tg7、Tg15 の心臓から蛋白質を抽出し、質量分析を行った。1,169 種類の蛋白質が同定され、 $p < 0.01$ で 20 個の蛋白質質量が変動していた。更に $p < 0.05$ で 73 個の蛋白質質量が変動していた。73 個の蛋白質についてパスウェイ解析およびネットワーク解析を行ったところ、電位依存性アニオンチャンネルなどのミトコンドリア関連蛋白質や、カルシウムチャンネル関連蛋白質などが関与するシグナル伝達経路が変動していることが判明した。

【考察】mCbr1 Tg マウスでは、電位依存性アニオンチャンネルなどが関与するシグナル伝達経路が変動しており、生体内における CBR1 の重要性が示された。mCbr1 Tg マウスは、生体内での CBR1 の生理的意義を解明するための良い材料になると考えられた。