

## 学位請求論文の内容の要旨

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| 論文提出者氏名  | 成育科学領域 周産期医学教育研究分野 産科婦人科学講座<br>横山 美奈子 |
| (論文題目)<br>Development of transgenic mice overexpressing mouse carbonyl reductase 1<br>(Carbonyl reductase 1 過剰発現トランスジェニックマウスの作製)   |                                       |
| (内容の要旨：和文で 2,000 字程度)<br><緒言><br>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ジスクレオチドリリン酸依存性の還元酵素である。CBR1 は、キノン、プロスタグランジン、メナジオン、複数の生体異物など、多くのカルボニル化合物の還元を触媒する一方、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 <i>Cbr1</i> ( <i>mCbr1</i> ) を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、 <i>mCbr1</i> 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。<br><方法><br>3xFLAG タグ付き <i>mCbr1</i> (3xFLAG- <i>mCbr1</i> ) 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- <i>mCbr1</i> 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 <i>mCbr1</i> 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。 <i>mCbr1</i> 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。<br><結果><br>1. <i>mCbr1</i> を過剰発現する Tg マウスの作製<br>C57BL/6N マウスの受精卵に 3xFLAG- <i>mCbr1</i> 遺伝子を導入したところ、37 匹のマウスが出生した。PCR で挿入遺伝子の有無を評価したところ 5 匹が遺伝子を有していた。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。<br>2. 3xFLAG- <i>mCbr1</i> トランスジーン挿入コピー数および挿入部位の同定<br>Real-time PCR で 3xFLAG- <i>mCbr1</i> 遺伝子のコピー数を評価したところ野生型 (WT) を 2 とした場合、Tg7 と Tg15 のコピー数は 2.73 および 4.78 であった。この結果から、Tg7 は 3xFLAG- <i>mCbr1</i> 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- <i>mCbr1</i> が挿入されていることが判明した。<br>3. 主要臓器の 3xFLAG- <i>mCbr1</i> の mRNA および蛋白質の発現量<br>脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、子宮、卵巣の 8 臓器における 3xFLAG- <i>mCbr1</i> 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。心臓組織標本の免疫染色で、WT と比較して Tg7 および Tg15 で 3xFLAG- <i>mCbr1</i> が過剰発現していることも確認 |                                       |

した。

#### 4. 心臓における *mCbr1* 蛋白質の質量分析、パスウェイ解析およびネットワーク解析

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 個の蛋白質量が変動していた。更に  $p < 0.05$  で 73 個の蛋白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る。また、卵巣癌を発症する Tg マウスとの交配により、CBR1 が卵巣癌発症を抑制することを評価することが可能になった。更に、アントラサイクリン系抗がん剤の CBR1 を介した代謝物が心毒性を誘導することがわかっていることから、*mCbr1*Tg マウスはアントラサイクリン系抗がん剤による有害事象および心毒性の評価に利用できる。一方、CBR1 はダウン症 (21 番染色体のトリソミー) と関係があることが報告されており、CBR1 とダウン症の関係を評価するのにも有用であると考えられる。以上のように、*mCbr1* トランスジェニックマウスは、CBR1 の生理的意義の解明および CBR1 を介した多くの疾患に関する研究に有用である。