

審査の結果の要旨

氏名 小野 宏晃

本研究は、ゲノム編集技術、ウイルスベクターによる遺伝子過剰発現系、リン酸化プロテオミクスを組み合わせ、覚醒状態の維持に関わる因子の同定を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. Triple-target CRISPR により Protein kinase C (PKC) の遺伝子ファミリーに属する7種類の遺伝子について遺伝子欠損マウスを作製し、Snappy Sleep Stager (SSS) および脳波筋電図測定を用いて睡眠表現型の解析を行った。その結果、*Prkcg* の遺伝子欠損マウスは、覚醒から睡眠への遷移確率の有意な増加と、睡眠時間の有意な延長を示した。

2. AAV を用いた全脳スケールの遺伝子過剰発現系を用いて PKC $\gamma$  とその変異体をマウスに過剰発現させ、SSS を用いた睡眠表現型解析を行った。その結果、PKC $\gamma$  のリン酸化活性亢進型変異体を過剰発現した場合に覚醒から睡眠への遷移確率の有意な減少と、睡眠時間の有意な短縮を示した。この効果は、リン酸化活性喪失型変異体では見られないことも示した。

3. 生化学的な PKC $\gamma$  のリン酸化活性評価系と、セリンとスレオニン残基をグルタミン酸に置換した変異体（リン酸化模倣変異体）ライブラリーを用いて、網羅的な変異体アッセイを行った。その結果、7種類の変異体（S192E、T208E、T212E、T214E、S251E、S349E、S352E）はリン酸化活性が亢進することを示した。

4. AAV による過剰発現系と変異体ライブラリーを用いて、PKC $\gamma$  のリン酸化模倣変異体が睡眠覚醒表現型へ与える影響を調べた。その結果、T39E と S664E を過剰発現させた場合には、睡眠時間が減少することを示した。

5. 野生型マウスと *Prkcg* 遺伝子欠損マウスのリン酸化プロファイルをリン酸化プロテオミクスによって比較した結果、CACNA1A, CACNAB4 などの神経活動を制御する機能的タンパク質のリン酸化が減少していた。また、パスウェイ解析によって、*Prkcg* 遺伝子欠損マウスでは長期増強やドパミンシグナル、カルシウムシグナルに関わるタンパク質のリン酸化が減少していることを示した。

以上、本論文はマウスにおいて、覚醒状態の維持に PKC $\gamma$  が関わることを明らか

にした。また、リン酸化模倣変異体ライブラリーを用いた網羅的なアッセイと睡眠表現型解析から、PKC $\gamma$  はリン酸化模倣状態によってリン酸化活性が変化することを見出し、睡眠表現型に関与する可能性のある残基として T39 と S664 を見出した。さらに、PKC $\gamma$  は下流で種々の機能的シグナリングを修飾することを見出した。本研究は、覚醒維持に関わる新たな因子を同定し、その分子機能を解析することで、睡眠覚醒の制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。