

論文の内容の要旨

論文題目

Post-translational analysis of a novel sleep-regulating factor, SK channel by high-throughput and high-resolution ion channel profiling

(網羅的分子プロファイリングによる新規睡眠覚醒制御因子 SK チャンネルにおける翻訳後修飾制御機構の解析)

戸根大輔

背景と目的

睡眠覚醒はほとんど全ての多細胞生物に見られる基本的な生理現象である。睡眠の動的恒常性の理解を目指して、睡眠覚醒制御に関わる神経回路・神経核や脳内物質の探索などが行われてきた。これらの研究から睡眠覚醒サイクルと関連した神経活動を示す脳領域や、脳内物質の増減が明らかになってきたが、未だ睡眠覚醒の動的恒常性の制御基盤は解明されていない。睡眠中の脳波パターンおよび大脳皮質における単一神経細胞の電気活動記録から、睡眠時の皮質神経細胞には burst-firing と呼ばれる特徴的な発火パターンが見られることが明らかになっている。最近我々は睡眠時間の制御に、神経細胞におけるカルシウム依存的な過分極経路が重要な役割を担うこと、およびこの経路に関わる遺伝子を複数見出した。ここで同定された遺伝子のうち特に睡眠時間制御における重要性が示された遺伝子が *Kcnn2* である。*Kcnn2* は Ca^{2+} 依存性カリウムチャンネルである Small conductance K^+ channel 2 (SK2 チャンネル) をコードし、このチャンネルは神経細胞における burst-firing の形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで私は睡眠覚醒の動的恒常性の制御基盤としてタンパク質翻訳後修飾の一つであるリン酸化を想定し、リン酸化による SK2 チャンネルの質的制御が睡眠覚醒状態の切り替えに関わっているのではないかと考えた。本研究では SK2 チャンネルのリン酸化状態と機能制御の関係を網羅的に解析することで、SK2 チャンネルの機能制御に重要なリン酸化部位・リン酸化酵素の同定を行い、SK2 チャンネルリン酸化の睡眠覚醒制御への寄与を明らかにすることを目指した。

結果

CRISPR 法により作製された *Kcnn2* ノックアウト (KO) マウスについて EEG/EMG 測定による睡眠測定を行った。その結果 *Kcnn2* KO マウスでは野生型マウスと比較して NREM 睡眠が有意に減少することが明らかになった。さらに覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠の各状態間における遷移確率を解析した結果、*Kcnn2* KO マウスでは覚醒から NREM への遷移確率が野生型マウスに対して低下していることも明らかになった。この結果から *Kcnn2* KO マウスでは NREM 睡眠の導入が障害されていることが示唆された。さらに詳しい解析を行うため、*Kcnn2* KO マウスに対しケージ交換による覚醒誘導実験を行った。睡眠中の野生型マウスを新たな飼育ケージに移すと、その後一定時間覚醒が継続することが知られている。この実験により *Kcnn2* KO マウスでは野生型マウスに比べてケ

ージ交換による覚醒の導入効果が大きいことが示された。以上の結果から、SK2 チャンネルは睡眠誘導に重要な機能を担うことが示された。

睡眠誘導に重要な機能を持つことが示唆された SK2 チャンネルについて詳細な機能解析を行うためのハイスループットな機能評価系の構築を行った。293T 細胞に対する遺伝子導入の並列化、および蛍光測定を利用した SK2 チャンネル機能の評価系を組み合わせることで、ハイスループットな SK2 チャンネル機能評価系を構築した。続いて、この系を利用して、SK2 チャンネルにおけるリン酸化状態と機能の関係を解析するため、SK2 チャンネルに存在する 1 ヶ所を除く全てのリン酸化サイトについてリン酸化をミミックしたアスパラギン酸置換変異体を作製した。これらの変異体の機能を確立した評価系を用いて解析したところ、複数の機能亢進型および機能欠損型変異体が同定され、これらの残基がリン酸化を介した SK2 チャンネルの機能制御に関わる可能性が示唆された。

細胞内における SK2 チャンネルのリン酸化状態を解析するために、質量分析計を利用したリン酸化解析を行った。SK2 チャンネルを発現した 293T 細胞から細胞抽出液を作製し、免疫沈降法により SK2 チャンネルタンパク質を粗精製した。このサンプルを消化酵素によりペプチドに断片化し、さらにリン酸化ペプチドの濃縮を行った。このリン酸化ペプチドを質量分析に供することで SK2 チャンネルにおけるリン酸化部位の同定を行った。この結果、SK2 チャンネルにおける複数のリン酸化サイトの同定に成功した。この中には、SK2 チャンネルの機能抑制に重要であることが示唆されたリン酸化部位も含まれていた。一方で、SK2 チャンネルの機能亢進に重要であることが示唆された残基についてはこの条件でのリン酸化同定が困難であった。そこでこの残基を含んだ合成ペプチドを用いて、条件検討を行い、この残基のリン酸化解析に適した測定法を確立した。この方法を利用することで、機能亢進に関わる可能性が示唆された残基についても細胞内においてリン酸化を受けていることが明らかになった。以上の結果から生体内においてもこれらのリン酸化が SK2 チャンネルの機能制御に関与する可能性が示唆された。

続いて、SK2 チャンネルの制御に関わるリン酸化酵素の探索を行った。293T 細胞に活性化型リン酸化酵素または不活性化型リン酸化酵素を SK2 チャンネルと共に発現させ、その際の SK2 チャンネルの機能を解析することで、SK2 チャンネルの機能制御に関わるリン酸化酵素の探索を行った。その結果、SK2 チャンネルの機能抑制および機能亢進に関わると考えられる複数のリン酸化酵素が同定された。

さらに、SK2 チャンネルのリン酸化制御が睡眠制御に重要であるかを調べるために、*Kcnn2* KO ES 細胞に対し、*Kcnn2* レスキューカセットをノックインすることで野生型 SK2 チャンネルを発現する機能レスキューマウスの作製を行った。作製したレスキューマウスの睡眠表現型を測定すると、*Kcnn2* KO マウスで見られた睡眠時間の減少がレスキューカセットのノックインによりキャンセルされていた。この結果から、ノックインした *Kcnn2* レスキューカセットが睡眠制御における *Kcnn2* の機能を十分に担うことが示された。今後は、さらに野生型の代わりにリン酸化ミミック変異体をレスキューしたマウスを作製し、その睡眠表現型を解析することでこれらの残基のリン酸化と睡眠制御の関係を解析できると考えられる。さらに、レスキューマウスで発現する SK2 チャンネルには FLAG タグが挿入されていることから、本研究で確立したリン酸化プロテオミクス測定系と組み合わせることで、睡眠覚醒遷移と SK2 チャンネルのリン酸化状態の関係を詳細に解析することが可能である。

結論

本研究では新規睡眠制御因子 SK2 チャネルに着目した。まず、遺伝子 KO マウスの解析から、SK2 チャネルは睡眠導入に重要な役割を果たすことが示唆された。続いてこのチャネルのリン酸化と機能制御の関係を詳細に解析した結果、SK2 チャネルの機能制御に重要と考えられるリン酸化サイトを複数同定した。さらに SK2 チャネルの機能の抑制および亢進に関わると考えられるリン酸化酵素の同定に成功した。これらのリン酸化サイトおよびリン酸化酵素は SK2 チャネルを介した睡眠および覚醒誘導に重要な経路として働く可能性が考えられる。今後は本研究で確立したリン酸化プロテオミクス系およびレスキューマウス作製系を利用して、より SK2 チャネルを通じた詳細な睡眠覚醒制御の分子機構の解析を進めることが可能であり、この研究が睡眠覚醒制御の分子的な理解へつながることが期待される。