

審査の結果の要旨

氏名 戸根 大輔

本研究は睡眠覚醒制御に重要な役割を担うと考えられる *Kcnn2* 遺伝子およびその遺伝子産物である SK2 チャネルの翻訳後修飾制御について詳細な解析を行ったものである。独自に構築した SK2 チャネル機能の評価系および遺伝子改変マウスの行動解析により以下の結果を得ている。

1. *Kcnn2* ノックアウトマウスの解析により、このマウスは野生型マウスと比較して有意に NREM 睡眠が減少することが示された。また、*Kcnn2* ノックアウトマウスでは Wake から NREM への遷移確率が低下することから、*Kcnn2* 遺伝子の機能として睡眠導入への寄与が示唆された。
2. 293T 細胞に対する遺伝子導入の並列化および蛍光測定系を組み合わせることでハイスループットな SK2 チャネルの機能評価系を構築した。この系を用いて SK2 チャネルリン酸化ミミック変異体の網羅的な機能評価を行ったところ、機能亢進型および機能抑制型の変異体を複数同定した。この結果からこれらのリン酸化サイトが SK2 チャネルの機能制御を行う可能性が示唆された。
3. 質量分析計を用いて、培養細胞における SK2 チャネルのリン酸化状態を解析したところ、複数のリン酸化サイトが同定された。これらの中には変異体解析の結果から SK2 チャネルの機能に強い抑制効果を持つと考えられるリン酸化サイトも含まれていた。さらに、機能亢進に関わると考えられるリン酸化サイトをターゲットとして詳細な測定を行ったところ、これらのサイトについても細胞内でリン酸化を受けていることが示された。以上の結果から、実際の細胞内でもリン酸化による SK2 チャネルの機能制御が起こっていることが示唆された。
4. SK2 チャネルと同時にリン酸化酵素を発現させ、その際の SK2 チャネル機能を評価することで SK2 チャネルの機能制御に関わるリン酸化酵素の探索を行った。この結果、SK2 チャネルの機能抑制及び機能促進に関わると考えられる複数のリン酸化酵素を同定した。
5. 同定した SK2 チャネルのリン酸化制御が睡眠覚醒制御にどのように寄与するのかを評価するために、ES 細胞を利用した *Kcnn2* ノックアウトマウスへの *Kcnn2* 遺

伝子レスキュー系を構築した。野生型 *Kcnn2* 遺伝子をノックインすることによりノックアウトマウスで見られた睡眠時間の減少および覚醒から睡眠への遷移確率の低下が回復することが示された。

以上、本論文では SK2 チャンネルのリン酸化による機能制御の可能性および、それに関わるリン酸化部位、リン酸化酵素の候補を示しており、睡眠覚醒制御にかかわる分子基盤の解明につながる貢献をなすものである。このことから本論文は学位の授与に値するものと考えられる。