

氏名	中井 彩加
学位の種類	博士（神経科学）
学位記番号	博甲第 10886 号
学位授与年月	令和 5 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査学術院	人間総合科学学術院
学位論文題目	Roles of transcription factor AP-2 β in sleep regulation in mice
(マウスの睡眠制御における転写因子 AP-2 β の機能の解析)	
主査	筑波大学助教 博士（生命科学） 本城 咲季子
副査	筑波大学教授 博士（医学） 榊 正幸
副査	筑波大学准教授 博士（医学） 増田 知之
副査	筑波大学准教授 博士（理学） 高橋 阿貴

論文の内容の要旨

中井彩加氏の博士学位論文は、転写因子 AP-2 β (TFAP2B) が睡眠覚醒制御において果たす役割を、実験動物マウスを用いて検討したものである。必要な睡眠量に個人差があることは良く知られており、ヒトにおいて極端な短時間睡眠を示す家系の存在は、必要な睡眠量が遺伝的に規定されていることを強く示唆する。本論文はこのような睡眠異常を示す家系において報告された転写因子 AP-2 β (TFAP2B) のゲノム変異をマウスに導入し、転写因子 TFAP2B が睡眠時間を制御することを明らかにしたものである。その要旨は以下の通りである。

(目的) 著者はまず先行研究を概観し、睡眠量に影響を与えるゲノム変異について探索した。その結果、ヒトにおいて複数の睡眠表現型との関連が報告されており、かつ無脊椎生物の相同遺伝子も睡眠を制御することが報告されている、転写因子 TFAP2B に着目した。本論文は *Tfap2b* 遺伝子のノックアウト、およびヒトの睡眠異常家系で報告された点突然変異（睡眠時随伴症の K144 家系、短時間睡眠の K145 家系）をマウスに導入し睡眠に与える影響を解析することで、*Tfap2b* 遺伝子が睡眠量制御において果たす役割を明らかにすることを目指すものである。

(方法) 著者は、ヒトの睡眠異常家系と同様な一塩基変異（以下、*Tfap2b*^{K144}、*Tfap2b*^{K145}）を CRISPR/Cas9 システムを用いて導入している。また、全身性ノックアウトマウス (*Tfap2b*^{+/-}) をノックアウトマウスプロジェクトにて作製された *Tfap2b*^{tm1a (EUCOMM) Wtsi/+} を元に作製しこれらのマウス系統において、mRNA、タンパク質レベルでの変化を、cDNA のシークエンス解析およびウエスタンブロッティングを用いて解析している。コンディショナルノックアウトには *Tfap2b*^{fllox/fllox} マウス、および *Nestin-Cre* マウスを用いている。

著者はこれらの系統の掛け合わせにより生まれたさまざまな *Tfap2b* 変異マウスを用いて脳波、筋電を測定し、睡眠覚醒パターンの解析を行っている。

(結果) 著者は、*Tfap2b* 全身性ノックアウト系統 *Tfap2b*^{-/-}では野生型に比べ、mRNA、タンパク質ともに低い発現量を示し、ヘテロ接合体 *Tfap2b*^{+/-}では野生型と *Tfap2b*^{-/-}の中間程度の発現レベルを示したとしている。*Tfap2b*^{-/-}は生後まもなく死亡するため、睡眠覚醒解析は *Tfap2b*^{+/-}を用いて行われた結果、雄においては異常は観察されなかったが、雌においては覚醒時間が延長しノンレム睡眠時間の減少が観察されたとしている。

著者はヒトにおいて短睡眠と関連する *Tfap2b*^{K145}点変異の導入は、正常な mRNA の発現レベルを著しく低下させたこと、また、低い発現量ながら二種の mRNA 配列が確認され、シーケンシングの結果、エクソン5の5'側の二塩基、あるいはエクソン5全体が欠損していることを明らかにしている。どちらの mRNA もフレームシフトにより翻訳の早期終結が予測され、これと合致してタンパク質の発現レベルも低下しており、この *Tfap2b*^{K145/145}も生存率が低かったため、睡眠覚醒解析には *Tfap2b*^{K145/+}が用いられている。*Tfap2b*^{K145/+}の雄は睡眠覚醒に異常を示さなかったが、雌は睡眠覚醒の各ステージの持続時間に変化が観察され、特にノンレム睡眠の断片化が顕著であったこととしている。

著者はヒトにおいて睡眠時随伴症と関連する *Tfap2b*^{K144}点変異の導入は、mRNA の配列、発現量、タンパク質発現量に影響しなかったが、*Tfap2b*^{K144/+}の雄は暗期においてノンレム睡眠時間の低下を示したとしている。

さらに著者は TFAP2B の神経系における機能の重要性を検討するため、*Nestin-Cre* と *Tfap2b*^{flox/flox}の掛け合わせを行っている。全身性ノックアウトとは異なり *Nestin-Cre;Tfap2b*^{flox/flox}は胎生致死ではなかったため、睡眠覚醒解析を行った結果、神経系における *Tfap2b* 遺伝子のノックアウトにより、雄の覚醒時間が増加しノンレム睡眠量が減少することが明らかとなったとしている。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文は、ヒトにおいて重要性が示唆されていたゲノム変異を、最新の技術を用いてマウスに導入し、厳密にその機能を検証したという点において価値の高いものである。ヒトにおいて睡眠異常との因果関係が明らかでなかったゲノム変異 *Tfap2b*^{K145/+}がノンレム睡眠の断片化を、*Tfap2b*^{K144/+}と *Tfap2b*^{+/-}が、ノンレム睡眠時間の減少を引き起こすという因果関係を示した点が評価できる。また本論文は神経系における転写因子 TFAP2B の機能が低下することにより、睡眠要求量が低下することを示したものである。さらにマウス脳内での *Tfap2b* 遺伝子の発現部位も検討し、*Tfap2b* が青斑核や傍小脳脚核など睡眠覚醒制御に重要な脳領域で発現していることを示した点も、TFAP2B が睡眠覚醒を制御するメカニズムの理解の手がかりとして重要である。

以上、本論文はマウスの掛け合わせなど実験準備に時間を要するマウス遺伝学を駆使して、進化的に保存された転写因子 AP-2β (TFAP2B) による睡眠覚醒制御機構の一端を明らかにした価値のあるものである。

令和5年 1月 12日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。また、著者が学位を受けるために必要な知識・能力等 (コンピテンス) を修得していることを確認した。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (神経科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。