

1998-00384A

平成10年度

厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

研究報告書

主任研究者 (財)大阪バイオサイエンス研究所

名誉所長 早石 修

総括研究報告書

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

主任研究者 早石 修 (財)大阪バイオサイエンス研究所 名誉所長

研究要旨

睡眠および覚醒の内在性の調節物質であるプロスタグランジン (PG) D_2 および PGE_2 の作用機構に関する研究を進め、以下の研究成果を得た。(1) PGD_2 は脳を包むクモ膜に局在する PGD_2 受容体を刺激し、アデノシン $A2a$ 受容体を介して視束前野腹側外側部の神経核を活性化させ、同時に結節乳頭核のヒスタミン系覚醒中枢の活動を低下させて睡眠を誘発する。(2) PGD 合成酵素遺伝子の欠損したノックアウトマウスおよびヒトの PGD 合成酵素を大量に発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらの遺伝子変異マウスの睡眠覚醒を測定する無線方式の非拘束睡眠バイオアッセイシステムを完成させ、さらに動物のノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒を自動的に判定するコンピューターソフトを開発した。(3) PGD 合成酵素の結晶化に成功し 2.6\AA の分解能の X 線回折像を得た。(4) ヒト脳の可溶性画分に存在するグルタチオン要求性の異なる二種類の PGE 合成酵素を精製し、それらの cDNA クローニングを行った。

分担研究者

裏出良博 (財)大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 部長
佐藤伸介 (財)大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 研究員
渡部紀久子 (財)大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 研究員
江口直美 京都大学大学院医学研究科
高次脳形態学教室 助手

A. 研究目的

生化学的および分子生物学的手法を用いて、睡眠および覚醒の内在性調節物質である PGD_2 および PGE_2 の作用機構に関する基礎知識を深め、睡眠異常や睡眠覚醒障害の合理的な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) PGD_2 投与後のラット脳切片を作製し、c-Fos 蛋白質の免疫組織化学を行い、活性化された神経細胞の分布を調べる。
- 2) 各種アデノシン受容体作動薬をラットの脳内に投与し睡眠誘発効果を測定する。
- 3) ラットおよびマウスの皮下埋め込み型 2ch (脳波、筋電) 無線発信器を作製する。
- 4) 動物の脳波と筋電に基づきノンレム睡眠、レム

睡眠、覚醒を自動的に判定するソフトを開発する。

- 5) PGD 合成酵素遺伝子を欠損した ES 細胞をマウス胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、その後、交配によりノックアウトマウスを作製する。
- 6) ヒト PGD 合成酵素 cDNA を含むベクターをマウス受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作製する。
- 7) 遺伝子組換え型 PGD 合成酵素の大量発現系を確立し、精製酵素を用いた結晶化条件のスクリーニングを行う。
- 8) ヒト脳の可溶性画分に存在する PGE 合成酵素の精製を行う。

C. 研究結果

- 1) PGD_2 投与に特異的な c-Fos 蛋白質の発現が、クモ膜細胞と視束前野の腹側外側部 (VLPO) の神経細胞に観察された。一方、ヒスタミン作動性神経の起始部が存在する覚醒中枢の結節乳頭核 (TMN) の c-Fos 蛋白質の発現低下が観察された。さらに、VLPO および TMN の c-Fos 陽性神経細胞数は、それぞれ屠殺前一時間の動物の睡眠量および覚醒量と正の相関を示した。
- 2) 各種アデノシン受容体作動薬の中で、 $A2a$ 受容体作動薬が PGD_2 と同程度の強力な睡眠誘発作用を示し、 $A1$ 受容体作動薬にはその作用がないことを証明した。

- 3) ラットおよびマウスの皮下埋め込み型 2ch (脳波、筋電) 無線発信器の試作器を作成した。これを用いることにより、非拘束条件下における小型動物 (ラットおよびマウス) の睡眠バイオアッセイシステムが完成した。
- 4) ラットおよびマウスの脳波と筋電に基づき、5秒間隔でノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒を自動判定するソフトを開発した。
- 5) PGD 合成酵素の遺伝子を欠損させた独立 2 系統の純系ノックアウトマウス (129系および C57BL/6系) を作製した。現在、その繁殖と系統維持を行っている。
- 6) ヒト PGD 合成酵素を発現する独立 5 系統のトランスジェニックマウスを作製した。現在、それらの繁殖と系統維持を行っている。
- 7) 大腸菌を用いて発現させたマウス PGD 合成酵素の遺伝子組換え型酵素の結晶化に成功し、2.6 Å の分解能の X 線結晶回折像を得た。
- 8) ヒト脳の可溶性画分に存在するグルタチオン要求性の異なる二種類の PGE 合成酵素を精製し、それらの cDNA クローニングを行った。

D. 考察

研究結果 (1, 2) により、PGD₂ による睡眠誘発情報は以下のような伝達機構であると予想される。まず、動物の睡眠要求に依存して脳脊髄液の PGD₂ 濃度が上昇し、前脳基底部脳表面のクモ膜の PGD₂ 受容体を刺激する。その情報はアデノシン A_{2a} 受容体を介して VLPO の神経に伝わり、その神経を活性化させ同時に覚醒中枢である TMN の活動を抑制して、睡眠を誘発する。

研究結果 (3-6) により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムを非拘束条件下に測定するバイオアッセイシステムが完成し、PGD 合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析する方法が確立された。

研究結果 (7, 8) により、睡眠および覚醒の内在性の調節物質である PGD₂ および PGE₂ の生産を調整することにより睡眠覚醒を調整できる PGD 合成酵素および PGE 合成酵素の阻害剤の開発方法が確立された。

E. 結論

内在性の睡眠調節物質である PGD₂ は、脳脊髄液を介した液性の調節因子としてクモ膜に分布する受容体を刺激し、アデノシン A_{2a} 受容体を介して VLPO の神経を活性化させ同時に覚醒中枢である

TMN の活動を抑制して、睡眠を誘発すると考えられる。又、PGD 合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析するシステムを完成した。さらに、PGD₂ および PGE₂ の産生を調整することにより睡眠覚醒を調整する PGD 合成酵素および PGE 合成酵素の阻害剤の開発方法を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokugawa, Y., Kunishige, I., Kubota, Y., Shimoya, K., Nobunaga, T., Kimura, T., Saji, F., Murata, Y., Eguchi, N., Osa, H., Urade, Y., and Hayaishi, O.

Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma.

Biol. Reprod. 58, 600-607, 1998.

2. Gerashchenko, D.Y., Beuckmann, C.T., Marcheselli, V.L., Gordon, W.C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Hayaishi, O., and Bazan N.G.

Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) in iris, ciliary body, and eye fluids.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 198-203, 1998.

3. Scammell, T., Gerashchenko, D.Y., Urade, Y., Onoe, H., Saper, C., and Hayaishi, O.

Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7754-7759, 1998.

4. Satoh, S., Matsumura, H., and Hayaishi, O.

Involvement of adenosine A_{2A} receptor in sleep promotion. Eur. J. Pharmacol. 351, 155-162, 1998.

5. Garcia-Fernandez, L. F., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J., and Munoz, A.

Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) gene.

Mol. Brain Res. 55, 321-330, 1998.

6. Kubata, B. K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Horii, T., and Hayaishi, O.

Evidence of prostaglandin production by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.

S.Af. J. Sci. 94, 285-286, 1998.

7. Kubata, B. K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K., Hayaishi, O., and Horii, T.

Plasmodium falciparum produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans.

J. Exp. Med. 188, 1197-1202, 1998.

8. Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Gordon, W. C., Urade, Y., Bazan, N. G., and Hayaishi, O.

Dominant expression of rat prostanoid DP receptor mRNA in leptomeninges, inner segments of photoreceptor cells, iris epithelium, and ciliary processes. *J. Neurochem.* 71, 937-945, 1998.

9. Urade, Y. and Hayaishi, O.

Prostaglandin D₂ and sleep regulation.

Biochim. Biophys. Acta 1436, 606-615, 1999.

10. Eguchi, N., Minami, T., Shirafuji, N., Kanaoka, Y., Tanaka, T., Nagata, A., Yoshida, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.

Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 726-730, 1999.

<総説>

—英文—

1. Hayaishi, O.

Prostaglandin D synthase, β -trace and sleep. *Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, 347-350, 1998.

2. Hayaishi, O.

Prostaglandins and sleep. *Sleep-Wake Disorders*, 1-10, 1998.

—和文—

1. 早石 修

「プロスタグランジンと睡眠」, *日本臨床* 56 (2) 15-19, 1998

2. 早石 修

「眠りの謎」, *感染・炎症・免疫* 28 (1) 46-50, 1998

3. 松村 人志, 高畑 龍一, 早石 修

「ラット睡眠への影響」, *Progress in Medicine* 18, 1004-1009, 1998

4. 早石 修

「眠りの研究」, *尚志* No. 29, 6-7, 1998

5. 早石 修

「睡眠とプロスタグランジン」, *Clinical Neuroscience* 16 (117), 1998

6. 早石 修

「眠りの科学」, *Clinic Magazine* 4月号~9月号 連載, 1~6, 1998

7. 早石 修

「睡眠学ことはじめ」, *脳の科学* 20 (8) 829-832, 1998

8. 乾 隆, 裏出 良博, 早石 修

「プロスタグランジンD₂の基礎と臨床」, *BIO Clinica* 13 (13) 40-44, 1998

9. 早石 修

「眠りの謎」, *ビタミン* 72 (12) 659-667, 1998

10. 早石 修

睡眠を科学する —睡眠・覚醒調節の分子機構—, *麻酔* 47 (増刊) : S11-S17, 1998

11. 藤谷 靖志, 裏出 良博, 早石 修

「睡眠物質」, *日本老年医学会雑誌* 35 (11) 811-816, 1998

12. 早石 修

「追想 須田正己先生」, *生化学* 1月号, 1999

2. 学会発表

1) 早石 修

眠りの秘密, 4月14日, 発明の日・科学技術週間 発明協会, 大阪国際交流センター (大阪)

2) 早石 修

睡眠を科学する, 4月16日, 第45回日本麻酔学会総会, 特別講演, 鹿児島市民文化ホール (鹿児島)

3) 早石 修

眠りの謎, 5月28日, 第50回日本ビタミン学会, 特別講演, 京都市リサーチパーク (京都)

4) 早石 修

睡眠を科学する, 6月18日, 千里ライフサイエンス フォーラム, 千里クラブ (大阪)

5) 早石 修

睡眠を科学する —睡眠・覚醒調節の分子機構—, 7月23日, 東海ブレイン研究会, ホテルキャッスルプラザ (名古屋)

6) 早石 修

眠りの秘密, 10月3日, 大分医科大学創学20周年, 大分東洋ホテル (大分)

7) 早石 修

眠りの謎, 10月17日, 第71回日本生化学大会, 名古屋国際会議場 (名古屋)

8) 早石 修

科学技術と未来, 10月18日, 上野製薬 (株) 創業80周年記念講演, 大阪ロイヤルホテル (大阪)

9) 早石 修

眠りの謎, 10月21日, 大阪倶楽部 定例午餐会, (社) 大阪倶楽部 (大阪)

10) 早石 修

眠りの謎, 10月22日, 福井謙一先生追悼記念講演, 基礎化学研究所 (京都)

11) 早石 修

Molecular Mechanisms of Sleep-Wake Regulation -Roles of prostaglandin D₂ and E₂-、Lecture、1月25日、The 22nd International Symposium on Brain Sciences (Taniguchi Foundation)、ハプナビーチプリンスホテル、ハワイ (アメリカ)

12) 早石 修

Molecular Basis of Sleep-Wake Regulation、Chancellor's Award Lecture in Neuroscience、1月29日、レイジアナ州立大学医学部・神経科学センター、ニューオリンズ (アメリカ)

13) 早石 修

Molecular Basis of Sleep-Wake Regulation、Invited Lecture、2月1日、スタンフォード大学医学部、スタンフォード (アメリカ)

14) 早石 修

眠りの謎、平成11年3月15日、徳島大学 山本尚三教授定年退官行事 学術講演会「生命科学の最前線」、徳島大学 (徳島)

分担研究報告書

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

分担研究者 裏出 良博 (財)大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 部長

研究要旨

内在性睡眠誘発物質であるプロスタグランジン(PG) D_2 および覚醒物質であるPGE $_2$ の作用機構に関する研究を進め、以下の研究成果を得た。(1) 前脳基底部のクモ膜にあるPG D_2 受容体を刺激すると、視束前野腹側外側部の神経が睡眠量の増加と相関して活性化され、ヒスタミン系の覚醒中枢である結節乳頭核の活動が抑制される。(2) マウスの睡眠覚醒を測定する無線方式の睡眠バイオアッセイシステムを完成させた。(3) PGD合成酵素の遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作製した。(4) ヒトPGD合成酵素を大量に発現するトランスジェニックマウスを作製した。(5) PGD合成酵素の結晶化に成功し、そのX線結晶構造解析を開始した。(6) ヒト脳の可溶性画分に存在するグルタチオン要求性の異なる二種類のPGE合成酵素を精製し、それらのcDNAを単離した。

A. 研究目的

内在性睡眠誘発物質であるPG D_2 の作用機構を解明するために、その情報伝達に参与するPG D_2 受容体およびその刺激を受けて活性化される神経細胞の局在を調べる。同時に、PG D_2 生合成を人為的に増減させた遺伝子変異マウスを作製して、それらの睡眠量や睡眠内容および睡眠覚醒リズムの変化を調べる。さらに、PG D_2 およびPGE $_2$ 生合成を阻害することにより覚醒レベルを増減させる薬剤を開発するために、PGD合成酵素およびPGE合成酵素の構造解析を行う。

B. 研究方法

- 1) PG D_2 投与後のラット脳を用いてc-Fos蛋白質の免疫組織化学を行い、睡眠中に活性化される神経細胞の分布を調べる。
- 2) マウスの皮下埋め込み型2ch(脳波、筋電)無線発信器を作製する。
- 3) PGD合成酵素遺伝子を欠損したES細胞をマウス胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、その後、交配によりノックアウトマウスを作製する。
- 4) ヒトPGD合成酵素cDNAを含むベクターをマウス受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作製する。
- 5) 遺伝子組換え型PGD合成酵素のX線結晶構造解析を行う。
- 6) ヒト脳の可溶性画分に存在するPGE合成酵素のcDNAクローニングを行う。

C. 研究結果

- 1) 前脳基底部クモ膜下腔へのPG D_2 投与により誘発される徐波睡眠に特異的なc-Fos蛋白質の発現が、クモ膜細胞と腹側外側視束前野(VLPO)の神経細胞に観察された。又、ヒスタミン神経系の起始部が存在する覚醒中枢である結節乳頭核(TMN)のc-Fos発現が低下することを見出した。さらに、VLPOおよびTMNのc-Fos陽性神経細胞数は、それぞれ屠殺前一時間の動物の睡眠量および覚醒量と正の相関を示した。
- 2) マウスの皮下埋め込み型2ch(脳波、筋電)無線発信器の作製し、非拘束条件下にマウスの睡眠覚醒が測定できた。
- 3) PGD合成酵素の遺伝子を欠損させた独立2系統の純系ノックアウトマウス(129系およびC57BL/6系)を作製した。現在、その繁殖と系統維持を行っている。
- 4) ヒトPGD合成酵素のトランスジェニックマウスを作製した。現在、独立5系統のコロニーの繁殖と系統維持を行っている。
- 5) 大腸菌を用いて大量発現させた遺伝子組換え型のマウスPGD合成酵素型酵素の結晶化に成功し、2.6Åの分解能のX線結晶回折像を得た。
- 6) ヒト脳可溶性画分より、グルタチオン要求性の異なる2種類のPGE合成酵素を精製した。その部分アミノ酸配列を決定し、その配列に基づくオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRにより、それらの酵素のcDNAをクローニングした。

D. 考察

研究結果 (1) より、PGD₂は前脳基底部脳表面のクモ膜のPGD₂受容体を刺激し、その刺激がVLPOおよびTMNに伝えられ、これらの神経細胞の活性化と活動抑制を引き起こすことにより、動物に睡眠を誘発すると考えられる。

研究結果 (2-4) により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムを非拘束条件下に測定するバイオアッセイシステムが完成し、PGD合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析する方法が確立された。

研究結果 (5, 6) により、PGD₂およびPGE₂産生を調整するPGD合成酵素およびPGE合成酵素阻害剤の理論的開発に必要なX線結晶構造解析に大きく前進した。

E. 結論

内在性の睡眠調節物質であるPGD₂は、脳脊髄液を介した液性の調節因子としてクモ膜に分布する受容体を刺激し、その情報が脳の表面からVLPOおよびTMNに伝達され、それらの部位の神経活動を調節することにより睡眠を誘発すると考えられる。又、PGD合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析するシステムを完成した。さらに、PGD合成酵素のX線結晶構造解析およびPGE合成酵素の精製とcDNAクローニングの成功は、PGD₂およびPGE₂の生産を調節することにより睡眠覚醒を調整する医薬品の理論的開発に大きく貢献する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Marcheselli, V. L., Gordon, W. C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Hayaishi, O., and Bazan, N. G. Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) in iris, ciliary body, and eye fluids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 198-203, 1998
- Tokugawa, Y., Kunishige, I., Kubota, Y., Shimoya, K., Nobunaga, T., Kimura, T., Saji, F., Murata, Y., Eguchi, N., Oda, H., Urade, Y., and Hayaishi, O. Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 58, 600-607, 1998
- Gerena, R. L., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D. A., and Killian, G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull

seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.* 58, 826-833, 1998

4. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., Oda, H., and Urade, Y.

Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J. Chromatogr. A* 802, 143-148, 1998

5. Kubata, K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K., Hayaishi, O., and Horii, T.

Plasmodium falciparum produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans. *J. Exp. Med.* 188, 1197-1202, 1998

6. Scammell, T., Gerashchenko, D. Y., Urade, Y., Onoe, H., Saper, C., and Hayaishi, O.

Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7754-7759, 1998

7. Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Gordon, W. C., Urade, Y., Bazan, N. G. and Hayaishi, O.

Dominant expression of rat prostanoid DP receptor mRNA in leptomeninges, inner segments of photoreceptor cells, iris epithelium, and ciliary processes. *J. Neurochem.* 71, 937-945, 1998

8. Kubata, B. K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Horii, T., and Hayaishi, O.

Evidence of prostaglandin production by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *South Af. J. Sci.* 94, 285-286, 1998

9. Garcia-Fernandez, L. F., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J., and Munos, A.

Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) gene. *Mol. Brain Res.* 55, 321-330, 1998

10. Eguchi, N., Minami, T., Shirafuji, N., Kanaoka, Y., Tanaka, T., Nagata, A., Yoshida, N., Urade, Y., Itoh, S., and Hayaishi, O.

Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 726-730, 1999

ヒト冠循環系におけるリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の分泌

Tokyo Bay Club (第5回 降圧系因子研究者の会): バイエル薬品主催, 平成10年9月26日, 広島

11. 裏出 良博

眠りの科学 - 遺伝子から行動まで-

大阪府立天王寺高校(関西サイエンス・フォーラム)

主催, 平成10年11月19日, 大阪

12. 裏出良博

「脳脊髄液主要蛋白プロスタグランジンD合成酵素の構造機能解析」

戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」のシンポジウム

"脳神経科学の最先端1998", 平成10年12月11日 (千里ライフサイエンスセンター) 大阪

13. 裏出良博

プロスタグランジンD合成酵素の機能と構造

理研シンポジウム「構造生物学(IV)」, 平成11年1月

12日, SPring-8, 兵庫

14. 裏出良博

睡眠調節の分子機構

呼吸生理フォーラム, 平成11年1月23日, メトロポリ

タンプラザ・メットホール, 東京

15. 裏出良博

プロスタグランジンD2研究の新展開: 蛋白工学、分子生物学から行動解析まで

キッセイ薬品中央研究所, 平成11年2月18日, 長野

16. 裏出良博

プロスタグランジンD2合成酵素の結晶構造解析

JST(科学技術振興事業団)研究会, 平成11年3月24日,

SPring-8, 兵庫

プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損マウスの作製と睡眠解析

第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, Neuroscience Research, Suppl.22, p.S221, 平成10年9月23日, 東京

7. Gerashchenko, D. Y., Scammell, T., Onoe, H., Urade, Y., Saper, C., and Hayaishi, O.

The somnogen PGD₂ induces FOS expression within unique populations of sleep-active neurons.

第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, Neuroscience Research, Suppl.22, p.S221, 平成10年9月23日, 東京

8. 江口直美, 南 敏明, 金子武嗣, 裏出良博 伊藤誠二, 早石 修

遺伝子工学的手法を用いたプロスタグランジンD合成酵素の機能解析

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.616, 平成10年10月14日, 名古屋

9. Pinzar, E. I., Kanaoka, Y., Miyano, M., Kikuno, R., Urade, Y. and Hayaishi, O.

Catalytic mechanism and substrate-binding mode of hematopoietic prostaglandin D synthase by site-directed mutagenesis.

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1081, 平成10年10月14日, 名古屋

10. Kubata, B. K., Eguchi, N., Yamashita, K., Tai, K., Mitamura, T., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O.

P. falciparum produces prostaglandin D₂, E₂, and F_{2α}.

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1081, 平成10年10月14日, 名古屋

11. Beuckmann, C. T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Urade, Y. and Hayaishi, O.

Non-substrate ligand binding of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace).

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1080, 平成10年10月14日, 名古屋

12. Gerashchenko, D. Y., Scammell, T., Onoe, H., Urade, Y., Saper, C. B., and Hayaishi, O.

FOS expression in brain induced by somnogen PGD₂.

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1081, 平成10年10月14日, 名古屋

13. 金岡禧秀, 菊野玲子, 裏出良博, 早石 修
造血器型プロスタグランジンD合成酵素の遺伝子構造

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1081, 平成10年10月17日, 名古屋

14. 入倉大祐, 裏出良博, 早石 修

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の結晶化

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1080, 平成10年10月17日, 名古屋

<講演>

1. 裏出良博

プロスタグランジンD2合成酵素～構造と機能

昭和大学薬学部衛生化学教室, 平成10年1月12日, 東京

2. 裏出良博

プロスタグランジンD合成酵素 一酵素学から遺伝子工学へ

愛媛大学医学部薬理学教室, 平成10年5月22日, 愛媛

3. 裏出良博

脳髄膜神経相関の分子機構

千葉大学医学部生理学第二講座, 平成10年6月15日, 千葉

4. Yoshihiro Urade

Rediscovery of β -trace.

Neurologische Klinik, Göttingen University, July 8, Göttingen, Germany, 1998

5. Yoshihiro Urade

Prostaglandin metabolism and sleep.

Dept. of Biochemistry, Tübingen University, July 10, Tübingen, Germany, 1998

6. 裏出良博

プロスタグランジンD合成酵素研究の最新動向

Milli-FEST (日本ミリポア株式会社主催), 平成10年7月15日, 東京

7. 裏出良博

睡眠物質(プロスタグランジンD)合成酵素の構造と機能

JASRI (高輝度光科学研究センター), 平成10年8月12日, 兵庫

8. Yoshihiro Urade

Structure and function of prostaglandin D synthase (β -trace).

Dept. of Neurology, New York University Medical Center, Sept.8, New York, U.S.A., 1998

9. 裏出良博

Applied researches on protein crystals (蛋白質結晶に関わる応用研究について)

宇宙環境利用国際シンポジウム, 平成10年9月22日, 東京

10. 裏出良博

＜総説＞

－英文－

1. Urade, Y. and Hayaishi, O.
Prostaglandin D₂ and sleep regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 606-615, 1999

－和文－

2. 裏出良博 (1998)
睡眠研究における遺伝子工学的アプローチ
「日本臨床」56号2号, 218～222頁, 日本臨牀社
3. 裏出良博, 江口直美 (1998)
プロスタグランジンD合成酵素定量による虚血性心疾患診断薬
「JSTニュース」4月号
4. 乾 隆, 裏出良博, 早石 修 (1998)
プロスタグランジンD₂の基礎と臨床
「BIO Clinica」13 巻13号, 40～44頁, 北隆館
5. 藤森 功, 裏出良博 (1998)
PGD合成酵素
「現代医療」31巻1号, 157～162頁, 現代医療社
6. 藤谷靖志, 裏出良博, 早石 修 (1998)
睡眠物質
「日本老年医学会誌」35巻11号, 811～816頁
7. 裏出良博 (1999)
特集によせて-睡眠調節における脳膜神経相関
「脳の科学」21巻3号, 257-263頁
8. 望月貴年, 裏出良博 (1999)
睡眠と時計遺伝子
「Annual Review 神経 1999」中外医学社 1999年1月20日発行, 9～18頁

2. 学会発表

－国際学会－

1. Kubata B. K., Duszenko, M., Urade, Y., and Hayaishi, O.
Evidence of the biosynthetic pathway for prostaglandins in parasitic protozoan *T. b. brucei*.
A one day seminar on new concepts for old diseases: Innovative approaches in research on parasitic diseases organized by Eijkman Institute for Molecular Biology and WHO/TDR, September 1, 1998
2. Ueda, N., Mahmud, I., Yamaguchi, H., Yamashita, R., Yamamoto, S., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.
Expression of cyclooxygenase and prostaglandin D synthase human megakaryoblastic cell lines.
The 5th Chinese-Japanese Symposium on Blood

Coagulation, Fibrinolysis and platelets, p.45, Oct.1-3, Hamamatsu, Japan, 1998

3. Kijima, Y., Matsu-ura, Y., Hashimura, K., Kato, Y., Yasuda, T., Ueda, T., Oda, H., Eguchi, Y., Eguchi, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.

Lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase in systemic circulation.

International Society for Heart Research, The 15th Annual Meeting of the Japanese Section, Dec. 9-10, Tokyo, Japan, 1998

4. Taniike, M., Eguchi, N., Okada, S., Suzuki, K., and Urade Y.

Upregulation of prostaglandin D synthase in oligodendrocytes of demyelinating mutant, Twitcher.

Society for Neuroscience, the 28th Annual Meeting, p.1204, November 7-12, Los Angeles, USA, 1998

－国内学会－

1. 江口直美, 桑幡裕子, 金岡禧秀, 吉田進昭, 裏出良博, 早石 修

プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損マウスの作製と睡眠解析

日本睡眠学会第23回学術集会, 190頁, 平成10年6月4-5日, 秋田

2. Gerashchenko, D. Y., Scammell, T., Onoe, H., Urade, Y., Saper, C. B., and Hayaishi, O.

The somnogen PGD₂ induces FOS expression within unique populations of sleep-active neurons.

日本睡眠学会第23回学術集会, 188頁, 平成10年6月4-5日, 秋田

3. Pinzar, I. E., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Kuwahata, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O.

Generation and sleep monitoring of prostaglandin D synthase transgenic mice.

日本睡眠学会第23回学術集会, 191頁, 平成10年6月4-5日, 秋田

4. 木島祥行, 松浦泰彦, 橋村一彦, 加藤洋二安田雄紀, 植田鉄也, 江口 豊, 江口直美, 織田浩司, 清木興介, 裏出良博

ヒト冠動脈硬化プラークでのリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の局在と冠循環中への分泌

日本動脈硬化学会総会, 平成10年6月11日, 東京

5. 裏出良博

蛋白質結晶に関わる応用研究について

宇宙環境利用国際シンポジウム(IN SPACE '98), 平成10年9月22日, 東京

6. 江口直美, 桑幡裕子, 金岡禧秀, 永田昭久, 吉田進昭, 裏出良博, 早石 修

分担研究報告書

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

分担研究者 佐藤 伸介 (財)大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 研究員

研究要旨

アデノシンA2a受容体刺激による睡眠促進機構が存在することを、アデノシンA2a受容体のノックアウトマウスを用いて確認した。

A. 研究目的

プロスタグランジンD₂による睡眠促進機構と脳内部の睡眠調節機構の関連を明らかにすることが本研究の目的である。脳内の睡眠調節系としては、アデノシン系に着目する。昨年度は、4種類のアデノシン受容体の中でも、アデノシンA2a受容体が睡眠促進に関わっているかを、選択的作動薬を用いて明らかにしたが、本年度はこの実験結果を、アデノシンA2a受容体のノックアウトマウスを利用して確認する。

B. 研究方法

実験動物にアデノシンA2a受容体のノックアウトマウスを用い、脳波・筋電活動を測定することによって睡眠・覚醒状態を判定する。微量持続脳内投与方法をマウス用に工夫して、アデノシン受容体作動薬による睡眠促進効果を検討する

C. 研究結果

アデノシンA2a受容体のノックアウトマウスにおいてはアデノシンA2a受容体作動薬の投与は、徐波睡眠・逆説睡眠の促進効果を起こさなかったが、同腹のwild typeやhetero typeのマウスにおいては徐波睡眠・逆説睡眠、の増加が認められた。

D. 考察

受容体特異性を確認するために、ノックアウトマウスを利用した。その結果、アデノシンA2a受容体を介する睡眠促進機構が存在することは、疑う余地のないものになった。さらに、どのような神経機構を介して睡眠という個体全体を包括する行動が生じるのかを明らかにしてゆく必要がある。

E. 結論

アデノシンA2a受容体の活動を介する睡眠促進機構が存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表

S., Satoh, H., Matsumura, and O., Hayaishi. Involvement of adenosine A2A receptor in sleep-promotion., Eur. J. Pharmacol. (1998) 351 155-162

S., Satoh; H., Matsumura, N., Koike, Y., Tokunaga, T., Maeda and O., Hayaishi. Region-dependent difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A2A receptor agonist. Eur. J. Neurosci. (1999 in press)

佐藤伸介 (1998) アデノシン・アミノ酸「日本臨牀」56巻, 296~301頁

2. 学会発表

第75回日本生理学会 (金沢)
第23回日本睡眠学会 (東京)
第23回神経科学学会 (東京)
第14回ヨーロッパ睡眠学会 (スペイン)

分担研究報告書

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

分担研究者 渡部 紀久子 (財)大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 研究員

研究要旨

プロスタグランジン(PG)E合成酵素はラットの種々の臓器のミクロソーム画分に広く存在する。その中でも、精管に特に高い活性 (112 nmol/min/mg) を示し、次いで他の生殖器に高い活性 (10-20 nmol/min/mg) を示した。これらの臓器の酵素活性は主にGSH要求性であった。一方、心臓、脾臓及び子宮にはGSH非要求性のPGE合成酵素活性が存在した。この二つ酵素は、Km値や至適pHの違いから異なる酵素であることが示唆された。

A. 研究目的

プロスタグランジン(PG)E群は、脳・中枢神経系だけでなく、種々の臓器で産生され、発熱、発痛、免疫抑制、胃酸分泌抑制、気管支・血管拡張など様々な生理作用を惹起する生理活性物質である。このようにPGE₂の種々の重要な生理作用が明らかにされているにもかかわらず、その合成酵素については未だ不明な点が多く、PG研究の中でも残されている重要課題のひとつとなっていた。当研究者等は、長年不明であったPGE合成酵素の役割、本酵素とPGE₂の生理作用との関連を生化学的、分子生物学的、免疫化学的方面より明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

約200gの18週のSDラットを生理食塩にて還流後、各臓器の3倍量のジチオスレイトール (DTT) と0.3M NaClを含むリン酸緩衝液中でホモジニイズし、ミクロソーム画分を酵素源とした。酵素活性は40 μM PGH₂を基質とし、グルタチオン (GSH) の存在下と非存在下、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5) 中で24度C、1分間反応を行ない、薄層クロマトグラフィーで基質のPGH₂と反応生成物のPGE₂を分離後、そのラジオアイソトープより酵素活性を決定した。

C/ 研究結果

PGE合成酵素の臓器分布を調べた結果、生殖器 (精管、副睾丸など) に特に高いGSH要求性のPGE合成

活性を見いだした。それに対し、心臓、脾臓、及び子宮にGSH非存在下、それぞれGSH存在下の112%、116%、および123%のPGE合成酵素活性を見だし、これらの臓器のPGE合成酵素活性はGSH非要求性のPGE合成酵素に寄与することが示唆された。これら二つのPGE合成酵素の酵素的性質を精管と心臓のミクロソーム画分を用いて調べたところ、精管のPGE合成活性はGSHにより活性化され、その濃度0.2 mMで最も高い価を示した。一方、心臓のPGE合成活性はGSHにより活性化されなかった。さらに、精管と心臓のPGE合成酵素のKm値と至適pHを調べた結果、それぞれ精管で26 μMと6-7、心臓で83 μMと8以上であった。以上の結果、精管と心臓のPGE合成酵素は異なるものであり、前者はGSH要求性の酵素であり、後者は非要求性の酵素であることが明らかになった。

D. 考察

PGEは生体内に広く存在し、様々な生理活性を惹起するが、その合成酵素も生体内に広く分布している。今回の研究により、広く分布しているPGE合成酵素は少なくとも異なる二種類の酵素が存在し、その臓器によりその存在比率が異なることが考えられる。PGEの広い臓器分布や多様な生理活性は、その合成酵素においても多様性を示し、異なる生理活性が臓器によりその特異性を示し、各々の臓器で、あるいは細胞において異なる合成酵素がPGEの生合成に寄与していることが考えられる。

E. 結論

PGE合成酵素にはGSH要求性と非要求性の少なくとも二種類の異なる酵素が存在し、特に生殖器系に高いGSH要求性PGE合成酵素活性が存在する。一方、GSH非要求性PGE合成酵素は心臓、脾臓や子宮に存在することが明らかになった。両酵素のそれぞれの臓器分布、様々な生理活性との関連は酵素学的、分子生物学的、組織化学的など広い手法で進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, T., Fujii, Y., Miyano, M., Chen, L.-Y., Takahashi, T., and Watanabe, K.

cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 241-248, 1999

分担研究報告書

睡眠覚醒調節の分子機構とその臨床応用に関する研究

分担研究者 江口 直美 京都大学大学院医学研究科
高次脳形態学教室 助手

研究要旨

内在性睡眠誘発物質であるプロスタグランジン (PG) D₂の作用機構に関する研究を進め、以下の研究成果を得た。(1) ラットPGD₂受容体cDNAのクローニングを行った。(2) PGD₂受容体mRNAは脳を包むクモ膜に局在する。(3) マウスの睡眠覚醒を測定する無線方式の睡眠バイオアッセイシステムを完成させた。(4) PGD合成酵素の遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作製した。(5) ヒトのPGD合成酵素を大量に発現するトランスジェニックマウスを作製した。

A. 研究目的

内在性睡眠誘発物質であるPGD₂の作用機構を解明するために、その情報伝達の第一段階に関与するPGD₂受容体の局在を調べる。同時に、PGD₂生成を人為的に増減させた遺伝子変異マウスを作製して、それらの睡眠量や睡眠内容および睡眠覚醒リズムの変化を調べる。

B. 研究方法

- 1) ラットPGD₂受容体cDNAをRT-PCR法によりクローニングする。
- 2) PGD₂受容体アンチセンスRNAを用いたラット脳切片での*in situ* hybridizationを行い、PGD₂受容体mRNAの分布を調べる。
- 3) マウスの皮下埋め込み型2ch (脳波、筋電) 無線発信器を作製する。
- 4) PGD合成酵素遺伝子を欠損したES細胞をマウス胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、その後、交配によりノックアウトマウスを作製する。
- 5) ヒトPGD合成酵素cDNAを含むベクターをマウス受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作製する。

C. 研究結果

- 1) ラット脳内へのPGD₂投与による睡眠誘発作用の初発反応を司るPGD₂受容体のcDNAをクローニングし、その塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。
- 2) PGD₂受容体mRNAの発現を*in situ*

hybridization法により調べた結果、PGD₂受容体が脳を包むクモ膜に局在することを証明した。

- 3) PGD合成酵素の遺伝子操作がもたらす睡眠異常を解析するために、マウスの睡眠覚醒リズムを非拘束条件下に測定できる無線方式の睡眠バイオアッセイシステムを完成させた。
- 4) PGD合成酵素の遺伝子を欠損させた独立2系統の純系ノックアウトマウス(129系)を作製した。現在、その繁殖と系統維持を行っている。
- 5) ヒトPGD合成酵素のトランスジェニックマウスを作製した。現在、独立4系統のコロニーの繁殖と系統維持を行っている。

D. 考察

研究結果(1, 2)により、PGD₂受容体もPGD合成酵素と同様、脳を包むクモ膜に局在することから、PGD₂投与による睡眠誘発作用の初発反応は、脳を囲むクモ膜で起きると考えられる。

研究結果(3-5)により、PGD合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析する方法が確立された。

E. 結論

内在性の睡眠調節物質であるPGD₂は、クモ膜に分布する受容体を刺激し、その情報が脳の表面から睡眠中枢の神経に伝達されることにより睡眠を誘発すると考えられる。又、PGD合成酵素の遺伝子欠損や大量発現がもたらす睡眠異常を解析するシステムを完成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Marcheselli, V. L., Gordon, W. C., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Hayaishi, O., and Bazan, N.G.

Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) in iris, ciliary body, and eye fluids. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 198-203, 1998

2. Tokugawa, Y., Kunishige, I., Kubota, Y., Shimoya, K., Nobunaga, T., Kimura, T., Saji, F., Murata, Y., Eguchi, N., Oda, H., Urade, Y., and Hayaishi, O.

Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. Biol. Reprod. 58, 600-607, 1998

3. Gerena, R. L., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D. A., and Killian, G. J.

Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. Biol. Reprod. 58, 826-833, 1998

4. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., Oda, H., and Urade, Y.

Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. J. Chromatogr. A 802, 143-148, 1998

5. Kubata, K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K., Hayaishi, O., and Horii, T.

Plasmodium falciparum produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans. J. Exp. Med. 188, 1197-1202, 1998

6. Gerashchenko, D. Y., Beuckmann, C. T., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Gordon, W. C., Urade, Y., Bazan, N. G. and Hayaishi, O.

Dominant expression of rat prostanoid DP receptor mRNA in leptomeninges, inner segments of photoreceptor cells, iris epithelium, and ciliary processes. J. Neurochem. 71, 937-945, 1998

7. Kubata, B. K., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Horii, T., and Hayaishi, O.

Evidence of prostaglandin production by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. South Af. J. Sci. 94, 285-286, 1998

8. Eguchi, N., Minami, T., Shirafuji, N., Kanaoka, Y., Tanaka, T., Nagata, A., Yoshida, N., Urade, Y., Ito,

S., and Hayaishi, O.

Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 726-730, 1999

9. Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Irikura, D., Urade, Y., Suzuki, K., and Okada, S.

An apoptotic depletion of oligodendrocytes in the twitcher, the murine model of globoid cell leukodystrophy. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999 in press.

<総説>

-和文-

1. 裏出良博, 江口直美 (1998)

プロスタグランジンD合成酵素定量による虚血性心疾患診断薬

「JSTニュース」4月号

2. 江口直美 (1999)

脳髄神経相関-痛覚伝達機構の視点から

「脳の科学」21巻3号, 287~296頁

2. 学会発表

-国際学会-

1. Kijima, Y., Matsu-ura, Y., Hashimura, K., Kato, Y., Yasuda, T., Ueda, T., Oda, H., Eguchi, Y., Eguchi, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.

Lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase in systemic circulation.

International Society for Heart Research, The 15th Annual Meeting of the Japanese Section, Dec. 9-10, Tokyo, Japan (1998)

2. Taniike, M., Eguchi, N., Okada, S., Suzuki, K., and Urade Y.

Upregulation of prostaglandin D synthase in oligodendrocytes of demyelinating mutant, Twitcher.

Society for Neuroscience, the 28th Annual Meeting, p.1204, November 7-12, Los Angeles, USA (1998)

-国内学会-

1. 江口直美, 桑幡裕子, 金岡禎秀, 吉田進昭, 裏出良博, 早石 修

プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損マウスの作製と睡眠解析

日本睡眠学会第23回学術集会, 190頁, 平成10年6月4-5日, 秋田

2. Pinzar, I. E., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Kuwahata,

Y., Urade, Y. and Hayaishi, O.

Generation and sleep monitoring of prostaglandin D synthase transgenic mice.

日本睡眠学会第23回学術集会, 191頁, 平成10年6月4-5日, 秋田

3. 木島祥行, 松浦泰彦, 橋村一彦, 加藤洋二, 安田雄紀, 植田鉄也, 江口 豊, 江口直美, 織田浩司, 清木興介, 裏出良博

ヒト冠動脈硬化プラークでのリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の局在と冠循環中への分泌

日本動脈硬化学会総会, 平成10年6月11日, 東京

4. 江口直美, 桑幡裕子, 金岡禎秀, 永田昭久, 吉田進昭, 裏出良博, 早石 修

プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損マウスの作製と睡眠解析

第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, Neuroscience Research, Suppl.22, p.S221, 平成10年9月23日, 東京

5. 江口直美, 南 敏明, 金子武嗣, 裏出良博, 伊藤誠二, 早石 修

遺伝子工学的手法を用いたプロスタグランジンD合成酵素の機能解析

第71回日本生化学会大会シンポジウム, 生化学, 第70巻, 第8号, p.616, 平成10年10月14日, 名古屋

6. Kubata, B. K., Eguchi, N., Yamashita, K., Tai, K., Mitamura, T., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O.

P. falciparum produces prostaglandin D₂, E₂, and F_{2α}.

第71回日本生化学会大会, 生化学, 第70巻, 第8号, p.1081, 平成10年10月14日, 名古屋

7. 江口直美, 金子武嗣

ヒト先天性脱髄疾患モデル動物, TwitcherにおけるオリゴデンドログリアでのプロスタグランジンD合成酵素の増加

第104回日本解剖学会全国学術集会, 平成11年3月29-31日, 東京

