

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学とその臨床応用に関する研究

研究報告書

平成12年4月

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

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学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

(1) 内在性の睡眠物質であるプロスタグランジン (PG) D₂ による睡眠誘発情報は、前脳基底部脳表面のクモ膜の PG D₂ 受容体を刺激し、局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を引き起こす。その情報は、前脳基底部周辺のアデノシン A_{2a} 受容体を持つ神経細胞を介して、視床下部の睡眠中枢 (VLPO) に伝わり、その睡眠中枢の神経活動を活性化させ、同時に、視床下部後部のヒスタミン系覚醒中枢 (TMN) の活動を抑制して、睡眠を誘発すると考えられる。一方、内在性の覚醒物質である PGE₂ は、視床下部後部のヒスタミン系覚醒中枢を活性化して覚醒を誘発すると考えられる。(2) マウスの皮下埋め込み型 2 ch (脳波、筋電) 無線発信器の小型化、および、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトの改良により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムの非拘束条件下における測定法、および、睡眠異常の解析法の完成度が高められた。(3) ヒト PG D 合成酵素大量発現トランスジェニックマウスでは痛覚刺激による脳内 PG D₂ の増加を伴う徐波睡眠の発作が観察され、内因性の PG D₂ が徐波睡眠に関与することが示された。これは、世界で初めて作製された徐波睡眠の異常動物モデルである。(4) PG D 合成酵素の X 線結晶構造解析、および、ヒト脳 PGE 合成酵素の精製と遺伝子組換え蛋白質の発現により、PG D₂ および PGE₂ の生産を調整することにより睡眠覚醒を調整する PG D 合成酵素および PGE 合成酵素阻害剤の開発方法が確立された。

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 研究部長

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

望月 貴年

(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

(財)大阪バイオサイエンス研究所

第 2 研究部 副部長

細胞の分布を調べる。

- 2) ラット前脳基底部のくも膜下腔に PG D₂ を投与し、その局所における細胞外アデノシン濃度を in vivo マイクロダイアリシス法により測定する。
- 3) マウス PG D₂ 受容体に対する抗体を作製し、その脳内分布を免疫組織化学的に調べる。
- 4) ラットおよびマウスの皮下埋め込み型 2 ch (脳波、筋電) 無線発信器の小型化を行い、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトの改良を行う。
- 5) PG D 合成酵素遺伝子を欠損したノックアウトマウスおよびヒト PG D 合成酵素を大量発現するトランスジェニックマウスの睡眠を測定する。
- 6) 遺伝子組換え型マウス PG D 合成酵素の X 線結晶解析を行い、三次元構造を決定する。
- 7) ヒト脳 PGE 合成酵素 cDNA を用いて、遺伝子組換え蛋白質の発現と精製を行う。
- 8) ラット後部視床下部に PGE₂ を投与し、細胞外ヒスタミン濃度を in vivo マイクロダイアリシス法により測定する。

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 PG D₂ および PGE₂ の作用機構に関する基礎知識を深め、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 前脳基底部のくも膜下腔にアデノシン A_{2a} 受容体作動薬を投与したラット脳を用いて c-Fos 蛋白質の免疫組織化学を行い、活性化された神経

C. 研究結果

- 1) アデノシン A2a 受容体作動薬の投与により誘発される睡眠に特異的な c-Fos 蛋白質の発現が、視束前野の腹側外側部 (VLP0) 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。
- 2) PGD_2 の投与量に依存した細胞外アデノシン濃度の上昇が確認され、その効果は PGD_2 受容体拮抗薬の前投与により抑制された。
- 3) マウス PGD_2 受容体に対する抗体の作製に成功し、同受容体が前脳基底部のくも膜に局在することを証明した。
- 4) マウスの腰部皮下への埋め込みが可能な小型無線発信器 (総重量 4 グラム以下) を開発した。一方、睡眠覚醒自動判定ソフトの改良を進め、睡眠経過図、睡眠時の集積周波数解析、並びに、熟睡度の指標であるデルタパワーの計算を容易にした。
- 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)、および、ヒト PGD 合成酵素を大量発現する独立 2 系統のトランスジェニックマウスの睡眠測定を行い、これらのマウスの基礎睡眠に大きな変化が認められないことが判明した。しかし、遺伝子解析用の DNA を調製するために行う尾末端の切断により、トランスジェニックマウスの徐波睡眠が選択的に増加し、その睡眠発作と同調した脳内 PGD_2 量の増加が見出された。
- 6) マウス PGD 合成酵素の遺伝子組換え型酵素の 2.6 Å 分解能の X 線結晶構造を決定した。
- 7) ヒト脳の可溶性画分に存在する二種類の PGE 合成酵素の遺伝子組み換え蛋白質を大腸菌を用いて発現させ、その酵素学的性質を明らかにした。
- 8) PGE_2 のラット後部視床下部への投与により、投与量に依存した細胞外ヒスタミン濃度の上昇とヒスタミン生合成酵素の誘導が起きることが判明した。

D. 考察

研究結果 (1-3) により、 PGD_2 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 PGD_2 濃度が上昇し、前脳基底部脳表面のクモ膜の PGD_2 受容体を刺激する。 PGD_2 受容体の活性化は、局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を引き起こし、前脳基底部周辺のアデノシン A2a 受容体を持つ神経細胞を活性化する。その情報は、さらに VLP0 に伝わり、VLP0 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 (4) により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムの非拘束条件下における測定法、および、睡眠異常の解析法の完成度が高められた。

研究結果 (5) により、 PGD 合成酵素の遺伝子欠損や大量発現は、マウスの基礎睡眠に変化を与えないことが明らかになった。一方、トランスジェニックマウスの痛覚刺激による睡眠発作は、内因性の PGD_2 が徐波睡眠に関与することを示している。同時に、このマウスは、世界で初めて作製された徐波睡眠の異常動物モデルであり、研究結果 (6) の成果との組み合わせにより、異常な眠気を抑制する PGD 合成酵素阻害剤の開発のための薬効評価系として利用することができる。

研究結果 (7) により、内在性の覚醒調節物質である PGE_2 の生産を調整することにより睡眠覚醒を調整する PGE 合成酵素阻害剤の開発方法が確立された。又、研究結果 (8) は、 PGE_2 の覚醒誘発効果がヒスタミン系覚醒中枢である TMN の活性化を伴うことを示唆し、研究結果 (1-3) の成果を補完する研究成果である。

E. 結論

内在性睡眠物質である PGD_2 は、脳脊髄液を介した液性の調節因子として前脳基底部のクモ膜に分布する PGD_2 受容体を刺激し、もう一つの睡眠物質であるアデノシンの細胞外濃度を上昇させ、アデノシン A2a 受容体を介した VLP0 の活性化と TMN の活動抑制により、睡眠を誘発すると考えられる。又、ヒト PGD 合成酵素の大量発現マウスが、痛覚刺激によ

る徐波睡眠発作を起こすことを発見した。さらに、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するPGD合成酵素およびPGE合成酵素の阻害剤の開発をより現実化した。

F. 研究発表

1. 論文発表

<英文>

1. Urade, Y. and Hayaishi, O. Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys. Acta*, 1436, 606-615, 1999
2. 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)
3. Satoh, S., Matsumura, H., Koike, N., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hayaishi, O. Region-dependent difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A2A receptor agonist. *European J. Neurosci.*, 11, 1587-1597 (1999)
4. Hayaishi, O. Prostaglandin D2 and sleep - a molecular genetic approach. *J. Sleep Res. (J. A. Horne ed., Blackwell Science Ltd.)*, 8, Suppl. 1, 60-64 (1999)
5. Hayaishi, O. The Enigma of Sleep: Molecular Mechanisms of Sleep-wake Regulation. Challenges for neuroscience in the 21st century [Taniguchi Symposia on Brain Sciences No.22] ed. by Hayaishi, O., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1-16 (1999)
6. Inui, T. Ohkubo, T., Urade, Y. and Hayaishi, O. Enhancement of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Enzyme Activity by Guanidine Hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 641-646 (1999)
7. Urade, Y. and Hayaishi, O. Prostaglandin D Synthase: Structure and Function. *Vitamins and Hormones (Gerald Litwack ed., Academic Press)*, 58, 89-120 (2000)
8. Hayaishi, O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - a role of prostaglandin D2 -. *Philosophical Transactions: Biological Sciences (S. Zeki F.R.S. ed., The Royal Society, London)*, 355, 275-280 (2000)
9. Hayaishi, O. Workshop IX "The Regulation of Sleep" (Alexander A. Borbély, Osamu Hayaishi, Terrence Sejnowski and Jennifer Altman ed.,

Human Frontier Science Program, Strasbourg)
(in press)

<和文>

1. 早石 修 (1999) 追想、須田正己先生、生化学、1月号、i-iii
2. 早石 修 (1999) アラキドン酸カスケード、-最近の進歩から-、日本産科婦人科学会雑誌、第51巻 第8号、514-522

2. 学会発表

<招待講演>

1. The Enigma of Sleep, Invited Lecture, The 22nd International Symposium on Brain Sciences by Taniguchi Foundation January 25, 1999 Hawaii, U.S.A.
2. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandin D2 and E2 -Award Lecture, Louisiana State University Medical Center School of Medicine, January 29, 1999 New Orleans, U.S.A.
3. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandin D2 and E2 -Invited Lecture, Stanford University School of Medicine, February 2, 1999 Stanford, U.S.A.
4. 眠りの謎、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、1999年3月15日
5. アラキドン酸カスケード -最近の進歩から-、第51回 日本産科婦人科学会 特別講演、東京 (ホテルニューオータニ)、1999年4月11日
6. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation, Invited Lecture, Human Frontier Science Program Workshop IX "The Regulation of Sleep", June 1, 1999, Strasbourg, France
7. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandin D2 and E2 -Invited Lecture, Claude Bernard University, June 4, 1999, Lyon, France
8. Molecular mechanisms of Sleep-Wake Regulation, 京都大学医化学100周年記念シンポジウム、京都大学医学部、京都、1999年6月27日
9. Studies with prostaglandin D synthase transgenic mice, Invited Lecture, The Third International Congress of the World Federation of Sleep Research Societies, October 6, 1999, Dresden, Germany
10. Prostaglandin D2 and the basal forebrain,

Invited Lecture, The Third International Congress of the World Federation of Sleep Research Societies, October 9, 1999, Dresden, Germany

11. 睡眠を科学する -睡眠・覚醒調節の分子機構-、第36回日本臨床生理学会 特別講演、ホテルサンガーデン千葉、1999年10月28日
12. 睡眠の謎 -眠りを調節する分子機構-、第52回日本自律神経学会総会 特別講演、広島国際会議場、1999年11月4日
13. バイオサイエンス -21世紀の科学、健康科学センター開所式記念講演、岐阜県保健環境研究所、2000年1月14日

<受賞>

1. Chancellor's Award Lecture in Neuroscience (レイジアナ州立大学医学部、神経科学センターより総長賞), LSU Medical Center School of Medicine, Neuroscience Center of Excellence, New Orleans, LA, USA, January 29, 1999
2. The Oxygen Club of California Award (カリフォルニア酸素クラブ賞) -酸素添加酵素の研究に対して-、Lifetime Honorary Member, The Oxygen Club of California (カリフォルニア酸素クラブ終身名誉会員)、Santa Barbara, California, USA, March 3-6, 1999
3. Distinguished Scientist Award of the World Federation of Sleep Research Societies, Third International Congress, Dresden, Germany, October 6, 1999

分担研究報告書

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学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 研究部長

研究要旨

(1) 内在性の睡眠物質であるプロスタグランジン (PG) D₂の合成酵素のX線結晶構造解析を行った。(2) 内在性の覚醒物質であるPGE₂の合成酵素の遺伝子組換え蛋白質の発現に成功した。(3) PGE₂は、視床下部後部のヒスタミン系覚醒中枢神経を活性化することを明らかにした。これらの成果により、PGD₂およびPGE₂の生産や情報伝達系を調整することにより睡眠覚醒を調整する医薬品の開発方法が確立された。

A. 研究目的

睡眠および覚醒の内在性の調節物質であるPGD₂およびPGE₂の合成酵素の精製と立体構造解析を進め、さらに、これらの物質による睡眠覚醒調節の情報伝達系を解析することにより、PGD₂およびPGE₂の生産を調整して睡眠覚醒を調整する医薬品の開発方法を確立する。

B. 研究方法

- 1) 大型放射光施設 (Spring-8) を利用して得られた遺伝子組換え型マウスPGD合成酵素のX線結晶回折像の計算処理を進め、本酵素の三次元構造を決定する。
- 2) ヒト脳PGE合成酵素 cDNA を大腸菌に導入し、遺伝子組換え蛋白質を発現させ、得られた精製酵素を用いて、その酵素学的性質を明らかにする。
- 3) ウレタン麻酔下に、ラットの視床下部後部にPGE₂を投与し、in vivo マイクロダイアリス法により細胞外ヒスタミン濃度を測定する。又、PGE₂投与ラットの後部視床下部を取り出し、ヒスタミン合成酵素の活性と mRNA 量を測定する。

C. 研究結果

- 1) マウスPGD合成酵素の遺伝子組換え型酵素の

2.6Å分解能のX線結晶構造を決定し、本酵素が疎水性ポケットを中央に持つベータバレル構造をとる蛋白質であることが判明した。

- 2) ヒト脳の可溶性画分に存在する二種類のPGE合成酵素の遺伝子組換え蛋白質を大腸菌を用いて発現させ、SDS電気泳動上、均一に精製した。両酵素は、共にミュー型のグルタチオン転移酵素遺伝子ファミリーに属する酵素であるが、PGE₂合成活性に差があることが明らかになった。
- 3) ラット後部視床下部へのPGE₂投与により、投与量に依存した細胞外ヒスタミン濃度の上昇が起こり、同時に、ヒスタミン合成酵素の誘導が起きることが判明した。

D. 考察

PGD合成酵素のX線結晶構造解析の結果、本酵素の活性中心の構造が明らかになり、基質や阻害剤候補化合物の結合モデル実験が可能になった。さらに、ヒト脳PGE合成酵素の精製と遺伝子組換え蛋白質の発現により、本酵素についても構造解析が可能になった。これらの研究成果により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するPGD合成酵素およびPGE合成酵素阻害剤の開発方法が確立された。さらに、PGE₂投与によるヒスタミン濃度の上昇は、後部視床下部のヒスタ

ミン系覚醒中枢の活性化を示唆している。

E. 結論

PGD合成酵素のX線結晶構造解析、ヒト脳PGE合成酵素の精製と遺伝子組換え蛋白質の発現、および、PGE₂投与によるヒスタミン系覚醒中枢の活性化の証明により、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する医薬品の開発方法が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表 —英文—

1. 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
 2. Mase, M., Yamada, K., Iwata, A., Matsumoto, T., Seiki, K., Oda, H., and Urade, Y., Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage., Neurosci. Lett. 270, 188-190, 1999
 3. Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Irikura, D., Urade, Y., Okada, S., and Suzuki, K., An apoptotic depletion of oligodendrocytes in the twitcher, a murine model of globoid cell leukodystrophy., J. Neuropathol. & Exp. Neurology 58, 644-653, 1999
 4. Beuckmann, C.T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Urade, Y. and Hayaishi, O., Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase., Biochemistry 38, 8006-8013
 5. Inui, T., Ohkubo, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., Enhancement of lipocalin-type prostaglandin D synthase enzyme activity by guanidine hydrochloride. Biochem. Biophys., Res. Commun. 266, 641-646, 1999
 6. Beuckmann, C.T., Urade, Y. and Hayaishi, O., Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) binds non-substrate lipophilic ligands., Adv Exp Med Biol (1999) 469, 55-60
 7. Beuckmann, C.T., Gerashchenko, D., Mizoguchi, A., Nomura, S., Mohri, I., Uesugi, A., Kaneko, T., Mizuno, N., Hayaishi, O., and Urade, Y., Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) in the central nervous system of the adult rat., Neurochem. Res. in press
 8. Beuckmann, C.T., Fujimori, K., Urade, Y., and Hayaishi, O., Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain., Neurochem. Res. in press
 9. Hiraoka, A., Seiki, K., Oda, H., Eguchi, N., Urade, Y., Arato, T., and Tominaga, I., β -Trace protein (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders., J. Anal. Bio-Sci. in press
 10. Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Okamoto, K., Kobayashi, T., Kaneko, T., Kawaguchi, S., Narumiya, S., Urade, Y. and Hayaishi, O., Localization of prostaglandin D2 receptor on the arachnoid cells at the basal leptomeninges in the adult mouse brain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press
 11. Gerashchenko, D., Okano, Y., Urade, Y., Inoue, S. and Hayaishi, O., Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D2- or adenosine A2a receptor agonist-induced sleep., J. Sleep Res. in press
 12. Gerena, R.L., Eguchi, N., Irikura, D., Urade, Y., and Killian, G.J., Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis, epididymis and on ejaculated sperm., Biol. Reprod. in press
 13. Inui, T., Ohkubo, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., Enhancement of lipocalin-type prostaglandin D synthase enzyme activity by guanidine hydrochloride. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press
 14. Kuwamoto, K., Miyauchi-Hashimoto, H., Tanaka, K., Eguchi, N., Inui, T., Urade, Y., and Horio, T. Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group a model mice., J. Invest. Dermatol. in press
 15. Gerena, R.L., Eguchi, N., Urade, Y., and Killian, G.J., Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis., J. Androl. in press
 16. Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H., and Narumiya, S., Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma., Science in press
- ##### 2. 学会発表 —国際学会—
1. Inoue, T., Okazaki, N., Kai, Y., Irikura, D., Hayaishi, O., Yamamoto, M., Kumasaka, T., and Urade, Y., X-ray crystallographic study of human hematopoietic prostaglandin D2

- synthase., 第18回国際結晶学会, Glasgow, Scotland, August 11, 1999
2. Fujitani, Y., Kanaoka, Y., Uodome, N., and Urade, Y., Overexpression of prostaglandin D synthase caused pronounced eosinophilic lung inflammation in response to antigen challenge in sensitized mice., 6th International Conference, Eicosanoids & Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, September 12-15, 1999
 3. Hayaishi, O., and Urade, Y., Prostaglandin D2 and the basal forebrain., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.675, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 4. Hayaishi, O., Pinzar, E., Eguchi, N., and Urade, Y., Studies with prostaglandin D synthase transgenic mice., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.124, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 5. Urade, Y., and Hayaishi, O., Molecular mechanism of sleep promotion by the endogenous somnogen, prostaglandin D2., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.732, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 6. Beuckmann, C. T., Fujimori, K., Urade, Y., and Hayaishi, O., Identification of glutathione transferases M2 and M3 as cytosolic prostaglandin E synthases in human brain., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.646, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 7. Gerashchenko, D., Okano, Y., Urade, Y., Inoue, S., and Hayaishi, O., Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D2- or adenosine A2A receptor agonist-induced sleep., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.35, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 8. Mochizuki, T., Satoh, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., and Hayaishi, O., Prostaglandin D2 increases extracellular levels of adenosine in the subarachnoid space of rats., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.153, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 9. Eguchi, N., Kuwahata, Y., Pinzar, E., Mochizuki, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., Sleep of gene-knockout and transgenic mice for prostaglandin D synthase., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.665, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 10. Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Fujimori, K., Inui, T., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., Prostaglandin biosynthesis in parasitic protozoan Trypanosoma B. Brucei., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.687, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 11. Pinzar, E., Eguchi, N., Inui, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., and Hayaishi, O., Induction of NREM sleep in lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice in response to the noxious stimulation., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.128, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 12. Irikura, D., Kumasaka, Y., Yamamoto, M., Urade, Y., and Hayaishi, O., Crystal structure of the somnogen-producing enzyme, lipocalin-type prostaglandin D synthase., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.125, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 13. Scammell, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., Hayaishi, O., and Saper, C., Activation of ventrolateral preoptic neurons by the adenosine A2A agonist, CGS21680., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.78, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 14. Scammell, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., Hayaishi, O., and Saper, C., Neural systems mediating prostaglandin D2-induced sleep., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.720, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
 15. Urade, Y., Sleep promoting factors., 1999 APS Conference: Determinants of vigilance: Interaction between the sleep and circadian systems and sleep research society training session, Florida, U.S.A., October 21, 1999
 16. Mochizuki, T., Satoh, T., Gerashchenko, D. Y., Urade, Y., and Hayaishi, O., A somnogen, prostaglandin D2, increases adenosine levels in the subarachnoid space of rats., Society for Neuroscience, the 29th Annual Meeting, Abstracts p.1615, Florida, U.S.A., October 27, 1999
 17. Eguchi, N., Minami, T., Murayama, K., Urade, Y., Ito, S., and Hayaishi, O., Lack of touch-evoked pain (Allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. Society for Neuroscience, the 29th Annual Meeting, Abstracts p.1442, Florida, U.S.A., October 26, 1999
 18. Mohri, I., Taniike, M., Eguchi, N., Okada, S., Urade, Y. and Suzuki, K., Different death mechanisms may be involved in the depletion of oligodendrocytes in the cerebrum and spinal cord of the demyelination mutant, twitcher., Society for Neuroscience, the 29th Annual Meeting, Abstracts p.1610, Florida, U.S.A., October 27, 1999
- 国内学会—
1. 江口直美, 桑幡裕子, 望月貴年, 裏出良博, 早石修, プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの睡眠解析, 日本睡眠学会第

- 24回学術集会, 抄録集 187頁, 6月12日, 広島, 1999
2. 望月貴年, 佐藤哲也, Gerashchenko, D., 裏出良博, 早石 修, ラット前脳基底部くも膜下腔へのプロスタグランジン D2 投与による細胞外アデノシン遊離量の増加, 日本睡眠学会第 24 回学術集会, 抄録集 152 頁, 6月13日, 広島, 1999
 3. Gerashchenko, D., Scammell, T., Urade, Y., Saper, C. B. and Hayaishi, O., Similarities between Fos expression in brain during sleep induced by prostaglandin D2 and A2a adenosine agonist CGS21680., 日本睡眠学会第 24 回学術集会, 抄録集 153 頁, 6月13日, 広島, 1999
 4. Pinzar, E., Inui, T., Eguchi, N., Kuwahata, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O., Sleep induction in lipocalin-type prostaglandin D synthase-transgenic mice after pain stimulation., 日本睡眠学会第 24 回学術集会, 抄録集 154 頁, 6月13日, 広島, 1999
 5. 望月貴年, 佐藤哲也, Gerashchenko, D., 裏出良博, 早石 修, 吻側前脳基底部くも膜下腔におけるプロスタグランジン D2 の細胞外アデノシン濃度におよぼす影響, 第 22 回日本神経科学大会, 抄録集 237 頁, 7月7日, 大阪, 1999
 6. 裏出良博, Gerashchenko, D., Scammell, T., Saper, C., 早石 修, 睡眠中枢に関する研究: プロスタグランジン D2 及び CGS21680 誘発睡眠時の脳内 Fos 発現, 第 22 回日本神経科学大会, 抄録集 141 頁, 7月6日, 大阪, 1999
 7. 江口直美, 南 敏明, 裏出良博, 伊藤誠二, 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痛覚伝達異常, 第 22 回日本神経科学大会, 抄録集 239 頁, 7月7日, 大阪, 1999
 8. 谷池雅子, 毛利育子, 江口直美, 裏出良博, 遺伝性脱髄モデルマウスのオリゴデンドログリアにおけるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の発現増強, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 984 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 9. 魚留信子, 藤谷靖志, 金岡禎秀, 裏出良博, 造血器型プロスタグランジン D 合成酵素トランスジェニックマウスの作製, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 771 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 10. 乾 隆, Beuckmann, C., 間瀬光人, 山田和雄, 清木興介, 中島 浩, 織田浩司, 中右博也, 裏出良博, くも膜下出血後脳脊髄液中のプロスタグランジン D 合成酵素の役割, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 771 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 11. 藤谷靖志, 金岡禎秀, 魚留信子, 裏出良博, リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素トランスジェニックマウスの作製とアレルギーモデルでの解析, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 1076 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 12. 藤森 功, 金岡禎秀, 坂口裕理子, 裏出良博, ヒト造血器型プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子の転写制御領域の解析, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 815 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 13. 入倉大祐, 熊坂 崇, 山本雅貴, 裏出良博, 早石 修, リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の結晶構造解析, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 771 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 14. 伊藤誠二, 南 敏明, 芦高恵美子, 江口直美, 裏出良博, 早石 修, 痛覚伝達におけるプロスタグランジンとノシチスタチンの役割, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 611 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 15. 萬谷 博, 佐藤雄治, 江口直美, 清木興介, 織田浩司, 中島 浩, 裏出良博, 遠藤玉夫, ヒト羊水中に存在するプロスタグランジン D 合成酵素(β -トレース)の糖鎖構造, 第 72 回日本生化学大会発表抄録集, 711 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
 16. 前山一隆, 黄 志力, 望月貴年, ストレス惹起による肥満細胞からのヒスタミン遊離機序, 第 4 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 講演要旨集, 11月13日, 大阪, 1999
 17. 熊坂 崇, 山本雅貴, 入倉大祐, 酒井宏明, 山下栄樹, 森山英明, 裏出良博, 植木龍夫, 早石 修, リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の結晶構造, 日本結晶学会, 平成 11 年度年会, 11月26日, 京都
 18. 黄 志力, 望月貴年, 森本智子, 山本由美子, 大和谷 厚, 裏出良博, 早石 修, プロスタグランジン E2 による神経性のヒスタミンの遊離, 第 4 回日本ヒスタミン研究会, 抄録集 17 頁, 12月3日, 別府, 1999
 19. 入倉大祐, 熊坂 崇, 山本雅貴, 裏出良博, 早石 修, リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の結晶構造と機能解析, 研究領域「脳を知る」のシンポジウム「脳神経科学の最先端 1999」, 12月3日, 名古屋
 20. 裏出良博, 脳膜による脳の機能調節, 研究領域「脳を知る」のシンポジウム「脳神経科学の最先端 1999」, 12月4日, 名古屋
 21. 藤森 功, 坂口裕理子, 裏出良博, ヒト造血器プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子の転写活性化における第 1 エキソンの役割, 第 22 回日本分子生物学会, 抄録集 350 頁, 12月7-10日, 福岡, 1999
 22. 岡村春樹, 藤谷靖志, 柏村信一郎, 上田晴康, 裏出良博, 筒井ひろ子, 中西憲司, IL-18 によるプロスタグランジン E2 の産生誘導, 日本免疫学会総会, 12月, 京都, 1999
- <総説>
-英文-
1. Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 606-61, 5, 1999
 2. Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D synthase: Structure and Function. *Vitamins and Hormones*. 58, 89-120, 2000
- 和文-
1. 藤森 功, 裏出良博, (1999), PGD 合成酵素, 「現代医療」31(1), 157-162
 2. 望月貴年, 裏出良博, (1999), 睡眠と時計遺伝子, 「Annual Review 神経 1999」1月20日号, 9-18 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, 2

分担研究報告書

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学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

プロスタグランジン（PG） D_2 による睡眠誘発の仲介物質であるアデノシンは、前脳基底部周辺に存在するアデノシン A_{2A} 受容体を持つ神経細胞を活性化し、その情報が視束前野の睡眠中枢（VLPO）神経の活性化と、後部視床下部のヒスタミン系覚醒中枢（TMN）の活動抑制を引き起こして睡眠を誘発すると考えられる。

A. 研究目的

PG D_2 による睡眠誘発の仲介物質であり、内因性睡眠物質の一つと考えられているアデノシンについて、その睡眠情報の伝達経路を追跡する。

B. 研究方法

ラット前脳基底部のくも膜下腔にアデノシン A_{2A} 受容体作動薬を投与して睡眠を誘発させる。その後、経時的に中性ホルマリンを用いてラットの還流固定を行い、脳を取り出し c-Fos 蛋白質の免疫組織化学を行う。

C. 研究結果

アデノシン A_{2A} 受容体作動薬の投与により、前脳基底部の多くの神経細胞に c-Fos 蛋白質が発現した。さらに、同作動薬の投与により誘発される睡眠に特異的な c-Fos 蛋白質の発現が、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）では、アデノシン A_{2A} 受容体作動薬の投与による c-Fos 蛋白質の発現低下が観察された。

D. 考察

前脳基底部周辺にはアデノシン A_{2A} 受容体を持つ神経細胞が存在することが示唆された。これらの神経細胞が活性化されると、その情報は VLPO 神経に伝えられ、それらの神経細胞を活性化し、同時に覚

醒中枢である TMN の活動を抑制すると考えられる。

E. 結論

アデノシンは、前脳基底部周辺に存在するアデノシン A_{2A} 受容体を持つ神経細胞を活性化し、その情報が視束前野の睡眠中枢である VLPO 神経の活性化と、後部視床下部のヒスタミン系覚醒中枢である TMN の活動抑制を引き起こして睡眠を誘発する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Satoh, S., Matsumura, H., Koike, N., Tokugawa, M., Maeda, T., and Hayaishi, O. Regional difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A_{2A} receptor agonist. Eur. J. Neurosci. 11(5), 1587-1597, 1999

2. 学会発表

- 第3回世界睡眠学会連合総会（ドイツ）

分担研究報告書

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学とその臨床応用に関する研究

分担研究者 望月 貴年（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D₂による睡眠誘発の作用機構を明らかにするため、ラット吻側前脳基底部くも膜下腔のアデノシン量を測定し、プロスタグランジンD₂投与による影響を検討した。

A. 研究目的

プロスタグランジン(PG)D₂はラットにおいて吻側前脳基底部の脳膜組織に作用し睡眠を誘発する。またPGD₂投与による睡眠増加はアデノシンA_{2A}受容体アンタゴニストの前処置で抑制される。よってPGD₂による睡眠誘発は脳膜周辺でアデノシンの作用を介して起こると考えられる。この仮説を検証するためにラット吻側前脳基底部くも膜下腔における細胞外アデノシン量を測定し、PGD₂投与による影響を検討した。

B. 研究方法

ウレタン麻酔下でラット吻側前脳基底部くも膜下腔にマイクロダイアリスプローブを刺入し、局所灌流により回収したサンプル中に含まれるアデノシンをHPLC-UV法で定量した。そして灌流部位へのPGD₂投与によるアデノシン量の変化を薬理的に検討した。

C. 研究結果

PGD₂ (100-400 pmol/分)およびPGD₂受容体(DP受容体)の選択的アゴニストであるBW 245C (400 pmol/分)のくも膜下腔への投与はアデノシン量を用量依存性に基礎遊離の2.2倍にまで増加した。また、PGD₂投与により誘発されるアデノシン量の増加は、DP受容体アンタゴニストであるBWA868C (0.1、1 mg/kg, iv)の前処置により量依存性に拮抗された。

D. 考察

PGD₂が吻側前脳基底部くも膜下腔のアデノシン量をDP受容体を介して増加することが明らかとなった。このアデノシンの増加により同部位の神経回路が影響を受け、睡眠調節に関わる神経群の活動が亢進すると思われる。

E. 結論

PGD₂は前脳基底部くも膜下腔のアデノシン量を増加させ、睡眠誘発機構に影響を与える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- T. Mochizuki, T. Satoh, D. Gerashchenko, Y. Urade, and O. Hayaishi. Prostaglandin D2 increases extracellular levels of adenosine in the subarachnoid space of rats. *Sleep Research Online* 1999 (1999)2·Suppl. 1, 153.
- T. Mochizuki, T. Satoh, D. Gerashchenko, Y. Urade, and O. Hayaishi. A somnogen, prostaglandin D2, increases adenosine levels in the subarachnoid space of rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* (1999) 25·Part 2, 1615.
- 望月貴年, 裏出良博 睡眠と時計遺伝子 *Annual Review 神経* (1999) 9-18.

2. 学会発表

- 第24回日本睡眠学会 (広島)
- 第22回日本神経科学大会 (大阪)
- 第3回世界睡眠学会連合総会 (ドイツ)
- 第29回北米神経科学学会 (アメリカ合衆国)

分担研究報告書

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学とその臨床応用に関する研究

分担研究者 江口 直美（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 副部長

研究要旨

（1）内在性の睡眠物質であるプロスタグランジン（PG）D₂の受容体に対する抗体を作製し、同受容体が前脳基底部のくも膜に局在することを証明した。（2）マウスの皮下埋め込み型2ch（脳波、筋電）無線発信器の小型化、および、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトの改良を行った。（3）PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびヒトPGD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスの睡眠解析を行い、本酵素の遺伝子欠損や大量発現は、マウスの基礎睡眠に変化を与えないが、トランスジェニックマウスでは痛覚刺激による脳内PGD₂の増加を伴う徐波睡眠の誘発が見出された。

A. 研究目的

内在性の睡眠調節物質であるPGD₂の情報を受けるPGD₂受容体の脳内分布を調べる。さらに、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒の測定法を改良し、これを用いてPGD合成酵素遺伝子欠損マウス、および、ヒトPGD合成酵素の大量発現トランスジェニックマウスの睡眠を行い、睡眠覚醒を調節する医薬品の開発の基礎を築く。

B. 研究方法

- 1) マウスPGD₂受容体に対する抗体を作製し、その脳内分布を免疫組織化学的に調べる。
- 2) ラットおよびマウスの皮下埋め込み型2ch（脳波、筋電）無線発信器の小型化を行い、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトの改良を行う。
- 3) PGD合成酵素遺伝子を欠損したノックアウトマウスおよびヒトPGD合成酵素を大量発現するトランスジェニックマウスの睡眠を測定する。

C. 研究結果

- 1) マウスPGD₂受容体に対する抗体の作製に成功し、同受容体が前脳基底部のくも膜に局在することを証明した。
- 2) マウスの腰部皮下への埋め込みが可能な小型無線発信器（総重量4グラム以下）を開発した。一方、睡眠覚醒自動判定ソフトを改良し、睡眠経過図、睡

眠時の集積周波数解析、並びに、熟睡度の指標であるデルタパワーの計算ソフトを追加した。

3) PGD合成酵素遺伝子欠損マウス、および、ヒトPGD合成酵素の大量発現トランスジェニックマウスの基礎睡眠に大きな変化は認められなかった。しかし、遺伝子解析用のDNAを調製するために行う尾末端の切断により、トランスジェニックマウスの徐波睡眠が選択的に増加し、その睡眠発作と同調した脳内PGD₂量の増加が観察された。

D. 考察

研究結果（1）により、PGD₂による睡眠誘発情報は前脳基底部のくも膜細胞のPGD₂受容体を刺激することにより、二次的な睡眠物質（おそらくアデノシン）を介して、脳内に伝達されると考えられる。研究結果（2）により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムの非拘束条件下における測定法、および、睡眠異常の解析法の完成度が高められた。研究結果（3）により、PGD合成酵素の遺伝子欠損や大量発現は、マウスの基礎睡眠に変化を与えないことが明らかになった。一方、痛覚刺激による睡眠発作を示すトランスジェニックマウスは、世界で初めて作製された徐波睡眠の異常動物モデルである。同時に、この睡眠発作は内因性に生成されたPGD₂が徐波睡眠の調節に関与することを直接的に示した研究結果である。

E. 結論

PGD₂受容体の前脳基底部クモ膜細胞への局在の証明、マウスの睡眠バイオアッセイ装置と解析ソフトの改良、および、ヒトPGD合成酵素の大量発現トランスジェニックマウスの痛覚刺激による徐波睡眠発作の発見により、睡眠覚醒の調節機構の解明が進み、将来の睡眠覚醒調節医薬品の開発方法が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Garcia-Fernandez, L. F., Iniguez, M. A., Eguchi, N., Fresno, M., Urade, Y., and Munoz, A.: Dexamethasone induces lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression in mouse neuronal cells. *J. Neurochem.* 2000, in press
2. Gerena, R. L., Eguchi, N., Urade, Y., and Killian, G. J.: Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis. *J. Androl.* 2000 in press
3. Pinzar, E., Kanaoka, Y., Inui, T., Eguchi, N., Urade, Y., and Hayaishi, O.: Prostaglandin D synthase gene is involved in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4903-4907, 2000.
4. Many, H., Sato, Y., Eguchi, N., Seiki, K., Oda, H., Nakajima, H., Urade, Y., and Endo, T.: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human lipocalin-type prostaglandin D synthase purified from urine and amniotic fluid, and recombinantly expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biochem.* 127: 1001-1011, 2000.
5. Hiraoka, A., Seiki, K., Oda, H., Eguchi, N., Urade, Y., Arato, T., and Tominaga, I.: b-Trace protein (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders. *J. Anal. Bio-Sci.* 23: 110-116, 2000.
6. Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H., and Narumiya, S.: Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma. *Science* 287,

2013-2017, 2000.

7. Kuwamoto, K., Miyauchi-Hashimoto, H., Tanaka, K., Eguchi, N., Inui, T., Urade, Y., and Horio, T.: Possible involvement of enhanced prostaglandin E₂ production in the photosensitivity in Xeroderma Pigmentosum group A model mice. *J. Invest. Dermatol.* 114 (2), 241-246, 2000
8. Gerena, R. L., Irikura, D., Eguchi, N., Urade, Y., and Killian, G. J.: Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis, epididymis and on ejaculated sperm. *Biol. Reprod.* 62, 547-556, 2000
9. 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.
10. Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Irikura, D., Urade, Y., Okada, S., and Suzuki, K.: An apoptotic depletion of oligodendrocytes in the twitcher, a murine model of globoid cell leukodystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (6), 644-653, 1999.

総説

1. 江口直美、裏出良博:「睡眠異常マウス」バイオサイエンスとインダストリー 印刷中, 2000.
2. 江口直美:「プロスタグランジン D₂ と痛み・炎症」炎症と免疫(先端医学社) 第7巻, 36-43, 1999.
3. 江口直美:「脳膜神経相関一痛覚伝達機構の視点から」脳の科学(星和書店) 第21巻, 287-296頁, 1999年

2. 学会発表

—国際学会—

1. Hayaishi, O., Pinzar, E., Eguchi, N., and Urade, Y., Studies with prostaglandin D synthase transgenic mice., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.124, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
2. Eguchi, N., Kuwahata, Y., Pinzar, E., Mochizuki, T., Urade, Y., and Hayaishi, O., Sleep of gene-knockout and transgenic mice for prostaglandin D synthase., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.665, Dresden, Germany, October 5-9, 1999

3. Pinzar, E., Eguchi, N., Inui, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., and Hayaishi, O., Induction of NREM sleep in lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice in response to the noxious stimulation., 3rd World Federation of Sleep Research Societies, Abstracts p.128, Dresden, Germany, October 5-9, 1999
4. Eguchi, N., Minami, T., Murayama, K., Urade, Y., Ito, S., and Hayaishi, O., Lack of touch-evoked pain (Allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. Society for Neuroscience, the 29th Annual Meeting, Abstracts p.1442, Florida, U.S.A., October 26, 1999
5. Mohri, I., Taniike, M., Eguchi, N., Okada, S., Urade, Y. and Suzuki, K., Different death mechanisms may be involved in the depletion of oligodendrocytes in the cerebrum and spinal cord of the demyelination mutant, twitcher., Society for Neuroscience, the 29th Annual Meeting, Abstracts p.1610, Florida, U.S.A., October 27, 1999

—国内学会—

1. Eguchi, N. and Kaneko, T., Upregulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase in oligodendrocytes of the congenital demyelinating mutant mice, twitcher., 第104回日本解剖学会, 総会・全国学術集会抄録号 79 頁, 3月29日, 東京, 1999
2. 江口直美, 桑幡裕子, 望月貴年, 裏出良博, 早石 修, プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの睡眠解析, 日本睡眠学会第24回学術集会, 抄録集 187 頁, 6月12日, 広島, 1999
3. Pinzar, E., Inui, T., Eguchi, N., Kuwahata, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O., Sleep induction in lipocalin-type prostaglandin D synthase-transgenic mice after pain stimulation., 日本睡眠学会第24回学術集会, 抄録集 154 頁, 6月13日, 広島, 1999
4. 江口直美, 南 敏明, 裏出良博, 伊藤誠二, 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痛覚伝達異常, 第22回日本神経科学大会, 抄録集 239 頁, 7月7日, 大阪, 1999
5. 谷池雅子, 毛利育子, 江口直美, 裏出良博, 遺伝性脱髄モデルマウスのオリゴデンドログリアにおけるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の発現増強, 第72回日本生化学大会発表抄録集, 984 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
6. 伊藤誠二, 南 敏明, 芦高恵美子, 江口直美, 裏出良博, 早石 修, 痛覚伝達におけるプロスタ

グランジンとノシチスタチンの役割, 第72回日本生化学大会発表抄録集, 611 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999

7. 萬谷 博, 佐藤雄治, 江口直美, 清木興介, 織田浩司, 中島 浩, 裏出良博, 遠藤玉夫, ヒト羊水中に存在するプロスタグランジン D 合成酵素(β -トレース)の糖鎖構造, 第72回日本生化学大会発表抄録集, 711 頁, 10月6-9日, 横浜, 1999
8. 江口直美, プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子変異マウスを用いた機能分析, 研究領域「脳を知る」のシンポジウム"脳神経科学の最先端1999", 12月3日, 名古屋

総合研究報告書

睡眠覚醒の生化学および遺伝子工学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 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 PGD_2 濃度が上昇し、前脳基底部脳表面のクモ膜の PGD_2 受容体を刺激する。 PGD_2 受容体の活性化は、局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を引き起こし、前脳基底部周辺のアデノシン $A2a$ 受容体を持つ神経細胞を活性化する。その情報は、さらに視床下部の睡眠中枢（VLPO）に伝わり、その睡眠中枢の神経活動を活性化させ、同時に、視床下部後部のヒスタミン系覚醒中枢（TMN）の活動を抑制して、睡眠を誘発する。一方、 PGE_2 は、視床下部後部のヒスタミン系覚醒中枢を活性化して覚醒を誘発する。（2）マウスの皮下埋め込み型 2ch（脳波、筋電）無線発信器の小型化、および、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトの改良により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムの非拘束条件下における測定法、および、睡眠異常の解析法の完成度が高められた。（3） PGD 合成酵素遺伝子欠損マウスおよびヒト PGD 合成酵素大量発現トランスジェニックマウスの睡眠解析により、本酵素の遺伝子欠損や大量発現は、マウスの基礎睡眠に変化を与えないが、トランスジェニックマウスでは痛覚刺激による脳内 PGD_2 の増加を伴う徐波睡眠の発作が観察され、内因性の PGD_2 が徐波睡眠に関与することが示された。これは、世界で初めて作製された徐波睡眠の異常動物モデルである。（4） PGD 合成酵素のX線結晶構造解析、および、ヒト脳 PGE 合成酵素の精製と遺伝子組換え蛋白質の発現により、 PGD_2 および PGE_2 の生産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 合成酵素阻害剤の開発方法が確立された。

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 研究部長
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
望月 貴年
（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
（財）大阪バイオサイエンス研究所
第2研究部 副部長

- 1) 前脳基底部のくも膜下腔に PGD_2 あるいはアデノシン $A2a$ 受容体作動薬を投与したラット脳を用いて 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) ラット前脳基底部のくも膜下腔に各種アデノシン受容体作動薬を投与し睡眠誘発効果を測定する。
- 3) ラット前脳基底部のくも膜下腔に PGD_2 を投与し、その局所における細胞外アデノシン濃度を in vivo マイクロダイアリシス法により測定する。
- 4) PGD_2 受容体の脳内分布を、in situ ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的に調べる。
- 5) ラットおよびマウスの皮下埋め込み型 2ch（脳波、筋電）無線発信器を作製し、動物の睡眠覚醒自動判定ソフトを開発する。
- 6) PGD 合成酵素遺伝子を欠損したノックアウト

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、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

マウスおよびヒト型PGD合成酵素を大量発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらの遺伝子操作マウスの睡眠異常の有無を検討する。

- 7) 遺伝子組換え型PGD合成酵素の大量発現系を確立し、精製酵素のX線結晶解析を行い、三次元構造を決定する。
- 8) ヒト脳の可溶性画分に存在するPGE合成酵素の精製とcDNAクローニングを行う。
- 9) ラット後部視床下部にPGE₂を投与し、細胞外ヒスタミン濃度を *in vivo* マイクロダイアリシス法により測定する。

C. 研究結果

- 1) PGD₂およびアデノシンA_{2a}受容体作動薬の投与による睡眠誘発に特異的なc-Fos蛋白質の発現が、視床前野の腹側外側部(VLP0)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、VLP0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、A_{2a}受容体作動薬がPGD₂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) PGD₂の投与量に依存した細胞外アデノシン濃度の上昇が確認され、その効果はPGD₂受容体拮抗薬の前投与により抑制された。
- 4) ラットPGD₂受容体cDNAのクローニングと、マウスPGD₂受容体に対する抗体の作製に成功し、同受容体が前脳基底部のくも膜に局在することを証明した。
- 5) マウスの腰部皮下への埋め込みが可能な小型無線発信器(総重量4グラム以下)を開発した。さらに、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、覚醒を自動判定し、睡眠経過図、睡眠時の集積周波数解析、並びに、熟睡度の指標であるデルタ

パワーを計算するソフトを開発した。これら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)の自動睡眠バイオアッセイシステムが完成した。

- 6) 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)、および、ヒトPGD合成酵素を大量発現する独立5系統のトランスジェニックマウスを作製した。独立2系統の純系ノックアウトマウスと酵素発現量の多い独立2系統のトランスジェニックマウスについて睡眠測定を行った結果、これらのマウスの基礎睡眠に大きな変化が認められないことが判明した。しかし、遺伝子解析用のDNAを調製するために行う尾末端の切断により、トランスジェニックマウスの徐波睡眠が選択的に増加し、その睡眠発作と同調した脳内PGD₂量の増加が起きることを見出した。
- 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分解能のX線結晶構造を決定した。
- 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。さらに、それらの遺伝子組み換え蛋白質を大腸菌を用いて発現させ、その酵素学的性質を明らかにした。
- 9) PGE₂のラット後部視床下部への投与により、投与量に依存した細胞外ヒスタミン濃度の上昇とヒスタミン生合成酵素の誘導が起きることが判明した。

D. 考察

研究結果(1-4)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、前脳基底脳表面のクモ膜のPGD₂受容体を刺激する。PGD₂受容体の活性化は、局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を引き起こし、前脳基底部周辺のアデノシンA_{2a}受容体を持つ神経細胞を活性化する。その情報は、さらにVLP0に伝わり、

VLP0 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 (5) により、遺伝子変異マウスの睡眠覚醒リズムの非拘束条件下における測定法、および、睡眠異常の解析法の完成度が高められた。

研究結果 (6) により、PGD 合成酵素の遺伝子欠損や大量発現は、マウスの基礎睡眠に変化を与えないことが明らかになった。一方、トランスジェニックマウスの痛覚刺激による睡眠発作は、内因性の PGD₂ が徐波睡眠に関与することを示している。同時に、このマウスは、世界で初めて作製された徐波睡眠の異常動物モデルであり、研究結果 (6) の成果との組み合わせにより、異常な眠気を抑制する PGD 合成酵素阻害剤の開発のための薬効評価系として利用することができる。

研究結果 (7、8) により、睡眠および覚醒の内因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。

研究結果 (9) は、PGE₂ の覚醒誘発効果がヒスタミン系覚醒中枢である TMN の活性化を伴うことを示唆し、研究結果 (1-4) の成果を補完する研究成果である。

E. 結論

内因性睡眠物質である PGD₂ は、脳脊髄液を介した液性の調節因子として前脳基底部のクモ膜に分布する PGD₂ 受容体を刺激し、もう一つの睡眠物質であるアデノシンの細胞外濃度を上昇させ、アデノシン A2a 受容体を介した VLP0 の活性化と TMN の活動抑制により、睡眠を誘発すると考えられる。これらの睡眠情報の伝達経路に関与する代謝系や神経核が、睡眠調節薬の開発の新たな標的候補である。又、ヒト PGD 合成酵素の大量発現マウスが、痛覚刺激による徐波睡眠発作を起こすことを発見した。この成果は、同時に、我々が世界初の徐波睡眠異常モデル動物を作製したことを意味する。さらに、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する PGD 合成酵素および PGE 合成酵素の

阻害剤の開発をより現実的にした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ram, A., Pandey, H. P., Matsumura, H., Kasahara-Orita, K., Nakajima, T., Takahata, R., Satoh, S., Terao, A., and Hayaishi, O., CSF levels of prostaglandins, especially the level of prostaglandin D2, are correlated with increasing propensity towards sleep in rats. *Brain Res.* 751, 81-89, 1997.
2. Yamashima, T., Sakuda, K., Tohma, Y., Yamashita, J., Oda, H., Irikura, D., Eguchi, N., Beuckmann, C. T., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O., Prostaglandin D synthase (β -trace) in human arachnoid and meningioma cells: Roles as a cell marker or in cerebrospinal fluid absorption, tumorigenesis, and calcification process. *J. Neurosci.* 17, 2376-2382, 1997.
3. Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A., and Hayaishi, O., Lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 15789-15797, 1997.
4. Ezashi, T., Sakamoto, K., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Ito, S., and Hayaishi, O., Genomic organization and characterization of the gene encoding bovine prostaglandin F2a receptor. *Gene* 190, 271-278, 1997.
5. Mahmud, I., Ueda, N., Yamaguchi, H., Yamashita, R., Yamamoto, S., Kanaoka, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D synthase in human megakaryoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28263-28266, 1997.
6. Watanabe, K., Kurihara, K., Tokunaga, Y., and Hayaishi, O., Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 148-152, 1997.
7. Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O., Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90, 1085-1095, 1997.
8. Eguchi, Y., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Kijima, Y., Matu-ura, H., Urade, Y., and Hayaishi, O., Expression of lipocalin-type

- prostaglandin D synthase (β -trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14689-14694, 1997.
9. Garcia-Fernandez, L. F., Rausell, E., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J., and Munoz, A., Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D2 synthase/ β -trace in specific areas of the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1566-1573, 1997.
 10. Satoh, S., Matsumura, H., Suzuki, F., and Hayaishi, O., Evidence that A2a-adenosine receptors in the rostral basal forebrain are involved in the regulation of sleep. *The Role of Adenosine in the Nervous System* (Okada, Y. ed., Elsevier Science B.V.), 207-213, 1997.
 11. Suzuki, T., Watanabe, K., Kanaoka, Y., Sato, T., and Hayaishi, O., Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in human megakaryocytic cells by phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 288-293, 1997.
 12. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., and Urade, Y., Analysis of low-molecular-mass proteins in cerebrospinal fluid by sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 697, 141-147, 1997.
 13. Dieter, P., Ambs, P., Fitzke, E., Creminon, C., Maclouf, J., Kanaoka, Y., and Urade, Y., Arachidonic acid cascade in kupffer cells. *Cells Hepatic Sinusoid* 6, 355-356, 1997.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Hiraoka, A., Arato, T., Tominaga, I., Eguchi, N., and Urade, Y., Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoretic analysis of molecular mass heterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J. Chromatogr.*, in press, 1998.
 18. Garcia-Fernandez, L. F., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J., and Munoz, A., Identification of a thyroid hormone response element in the 5'-flanking region of the rat lipocalin-type prostaglandin D2 synthase (β -trace) gene. *Mol. Brain Res.*, in press, 1998.
 19. 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.*, in press, 1998.
 20. 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*, in press, 1998.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Satoh, S., Matsumura, H., and Hayaishi, O., Involvement of adenosine A2A receptor in sleep promotion. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 155-162, 1998.
 25. 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.
26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 606-615, 1999.
 30. 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.
 31. Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys. Acta*, 1436, 606-615, 1999
 32. 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)
 33. Satoh, S., Matsumura, H., Koike, N., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hayaishi, O., Region-dependent difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A2A receptor agonist. *European J. Neurosci.*, 11, 1587-1597 (1999)
 34. Hayaishi, O., Prostaglandin D2 and sleep - a molecular genetic approach. *J. Sleep Res. (J. A. Horne ed., Blackwell Science Ltd.)*, 8, Suppl. 1, 60-64 (1999)
 35. Hayaishi, O., The Enigma of Sleep: Molecular Mechanisms of Sleep-wake Regulation. Challenges for neuroscience in the 21st century [Taniguchi Symposia on Brain Sciences No.22] ed.by Hayaishi, O., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1-16 (1999)
 36. Inui, T., Ohkubo, T., Urade, Y. and Hayaishi, O., Enhancement of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Enzyme Activity by Guanidine Hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 641-646 (1999)
 37. Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandin D Synthase: Structure and Function. *Vitamins and Hormones (Gerald Litwack ed., Academic Press)*, 58, 89-120 (2000)
 38. Hayaishi, O., Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - a role of prostaglandin D2 -. *Philosophical Transactions: Biological Sciences (S. Zeki F.R.S. ed., The Royal Society, London)*, 355, 275-280 (2000)
 39. Hayaishi, O., Workshop IX "The Regulation of Sleep" (Alexander A. Borb 四 y, Osamu Hayaishi, Terrence Sejnowski and Jennifer Altman ed., Human Frontier Science Program, Strasbourg) (in press)
- <総説>
-英文-
1. Hayaishi, O., Prostaglandins and Sleep. *Sleep-Wake Disorders (K. Meier-Ewert & M. Okawa eds., Plenum Press, N.Y.)* 1-10, 1997
 2. Hayaishil, O., Prostaglandin D synthase, β -trace and sleep. *Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, 347-350, 1998.
 3. Hayaishi, O., Prostaglandins and sleep. *Sleep-Wake Disorders*, 1-10, 1998.
- 和文-
1. 早石 修 (1997), プロスタグランジン D2 と睡眠、「随膜をめぐる問題」山嶋哲盛・木多真也 編 サイメッド・パブリケーションズ 85 ~ 91 頁
 2. 早石 修 (1997), 睡眠調整の鍵を握る、AERA Mook、「頭脳学のみかた。」朝日新聞社、152 ~ 154 頁
 3. 佐藤伸介、早石 修 (1997), アデノシン受容体、生体の科学、第48巻5号 465-467 頁
 4. 江口直美、裏出良博 (1997), プロスタグランジン D 合成酵素の最近の研究成果. *Isotope News* 11月号 : 6~11 頁
 5. 裏出良博 (1997), 睡眠研究における遺伝子工学的アプローチ (Gene engineering studies on sleep). *日本臨床 (Jpn J. Clin. Med.)* 56:

6. 早石 修 (1998), プロスタグランジンと睡眠、日本臨床、第 56 巻第 2 号、15-19 頁
 7. 早石 修 (1998), 眠りの謎、感染 炎症 免疫、Vol.23-1 46-50 頁
 8. 早石 修, 「プロスタグランジンと睡眠」, 日本臨床 56 (2) 15-19, 1998
 9. 早石 修, 「眠りの謎」, 感染・炎症・免疫 28 (1) 46-50, 1998
 10. 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
 11. 早石 修, 「眠りの研究」, 尚志 No. 29, 6-7, 1998
 12. 早石 修, 「睡眠とプロスタグランジン」, Clinical Neuroscience 16 (117), 1998
 13. 早石 修, 「眠りの科学」, Clinic Magazine 4 月号~9 月号 連載, 1~6, 1998
 14. 早石 修, 「睡眠学ことはじめ」, 脳の科学 20 (8) 829-832, 1998
 15. 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
 16. 早石 修, 「眠りの謎」, ビタミン 72 (12) 659-667, 1998
 17. 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
 18. 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
 19. 早石 修, 「追想 須田正己先生」, 生化学 1 月号, 1999
 20. 早石 修 (1999) 追想、須田正己先生、生化学、1 月号、i-iii
 21. 早石 修 (1999) アラキドン酸カスケード、- 最近の進歩から -, 日本産科婦人科学会雑誌、第 51 巻 第 8 号、514 - 522
2. 学会発表
1. 早石 修, Secrets of Sleep - Molecular mechanisms of sleep-wake regulation, The 10th Paul Ehrlich Lecture, 1997 年 4 月 2 日、National Institutes of Health, ベセスダ、(アメリカ)
 2. 早石 修, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandin D2 and E2, Invited Lecture, 1997 年 4 月 3 日、マサチューセッツ工科大学, ボストン、(アメリカ)
 3. 早石 修, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandins D2 and E2, Invited Lecture, 1997 年 4 月 4 日、ハーバード大学医学部, ボストン、(アメリカ)
 4. 早石 修, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandins D2 and E2, Invited Lecture, 1997 年 4 月 7 日、スクリプス研究所、サンディエゴ、(アメリカ)
 5. 早石 修, 睡眠の謎 - 睡眠を調節する分子機構 -, 1997 年 4 月 25 日、第 94 回日本内科学会総会、特別講演、大阪城ホール、(大阪)
 6. 早石 修, 遺伝子操作 - 未来医療へのインパクト、1997 年 5 月 22 日、第 98 回日本耳鼻咽喉科学会総会、特別講演、ホテルニューオータニ大阪、(大阪)
 7. 早石 修, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation - Roles of prostaglandins D2 and E2, Keynote Lecture, 1997 年 5 月 31 日、Mechanisms of Biological Oxidations Symposium、ペンシルバニア州立大学、(アメリカ)
 8. 早石 修, 眠りの謎、10 月 16 日、第 35 回日本社会保険医学会、特別講演、大阪厚生年金会館、(大阪)
 9. 早石 修, 睡眠調節の分子機構、プロスタグランジン D2 と E2 の役割、1997 年 10 月 23 日、第 40 回日本神経化学会、特別講演、松山市総合コミュニティセンター、(松山)
 10. 早石 修, 眠りの秘密、1997 年 10 月 25 日、大阪バイオサイエンス研究所創立 10 周年記念講演会、大阪国際交流センター、(大阪)
 11. 早石 修, 睡眠の謎 - 眠りを調節する分子機構 -, 1997 年 11 月 24 日、京都大学医学部吉田修教授退官記念講演会、京都都ホテル (京都)
 12. 早石 修, 睡眠の謎 - 眠りを調節する分子機構 -, 1997 年 12 月 13 日、荒木千里記念脳外科症例検討会歳末講演会、京都リサーチパーク、(京都)
 13. 早石 修, Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: Roles of prostaglandin D2 and E2, 1997 年 12 月 19 日、COE Symposium "Life and Oxygen", 東京大学山上会館、(東京)
- <招待講演>
1. 早石 修, 眠りの秘密、1998 年 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、1998 年 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、1998 年 5 月 28 日、第 50 回日本ビタミン学会、特別講演、京都リサーチパーク (京都)
 4. 早石 修, 睡眠を科学する、1998 年 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)