

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

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

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	1
早石 修		
II. 分担研究報告書		
1. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	4
裏出 良博		
2. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	6
江口 直美		
3. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	8
望月 貴年		
4. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	9
黄 志力		
5. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	-----	10
Michael Lazarus		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

睡眠覚醒の分子機構と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) 内因性睡眠物質であるプロスタグランジン (PG) D₂ は、前脳基底部のクモ膜に分布する PG D₂ 受容体を介して、第二の内因性睡眠物質であるアデノシンの細胞外濃度の上昇を起して徐波睡眠を誘発することを、野生型および PG D₂ 受容体遺伝子欠損マウスを用いて証明した。(2) さらに、PG D₂ 合成酵素遺伝子欠損マウスおよび PG D₂ 受容体遺伝子欠損マウスでは、断眠による睡眠要求の蓄積が起り難いことを発見し、PG D₂ が長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要であることを証明した。(3) 内因性覚醒物質である PGE₂ やオレキシンは、結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化し、脳内の遊離ヒスタミン濃度を上昇させることを証明した。(4) 小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発し、さらに、睡眠自動判定ソフトに睡眠判定アルゴリズムの自己学習機構を組み込んで睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系を整備した。(5) PG D₂ 合成酵素と PGE₂ 合成酵素の構造解析を進め、睡眠覚醒調節薬としての酵素阻害剤の開発を進めた。

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

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

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

黄 志力

(財)大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 受託研究員

Michael Lazarus

(財)大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 受託研究員

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因性調節物質である PG D₂ とアデノシン、および、PGE₂、オレキシン、ヒスタミン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) 無麻酔下のマウス脳室への薬物投与と睡眠覚醒の同時測定法を開発し、各種の遺伝子欠損マウスに応用する。
- 2) ウレタン麻酔下のマウス前脳基底部への微量脳内透析プローブの埋め込みを行い、クモ膜下腔における睡眠情報の変換機構を解析する。
- 3) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発する。
- 4) 動物睡眠自動判定ソフトを改良し、睡眠判定データの編集速度を向上させる。
- 5) PG D₂ 合成酵素の結晶化条件を改良し、阻害剤との複合体の結晶化を試みる。
- 6) 小胞体膜結合型 PGE₂ 合成酵素の cDNA クローニングを行い、遺伝子組換え型酵素を精製する。
- 7) ラットの覚醒中枢（結節乳頭核）への微量脳内透析プローブの埋め込みを行い、覚醒

情報の変換機構を解析する。

C. 研究結果

- 1) マウス脳室へのPGD2投与により、徐波睡眠の選択的な増加が起きるが、PGD2受容体遺伝子欠損マウスでは、PGD2の脳室内投与による睡眠誘発が起きないことを見出した。
- 2) マウス前脳基底部のクモ膜下腔において、PGD2投与による細胞外アデノシン濃度の上昇が起きるが、PGD2受容体遺伝子欠損マウスでは、その上昇が起きないことを見出した。
- 3) PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびPGD2受容体遺伝子欠損マウスは断眠による睡眠要求の蓄積が起り難いことを発見した。
- 4) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発した。
- 5) 動物睡眠自動判定ソフトに睡眠判定アルゴリズムの自己学習機構を組み込んだ。
- 6) PGD合成酵素と阻害剤との複合体の結晶化に成功した。
- 7) 小胞体膜結合型PGE合成酵素cDNAを単離し、大腸菌を用いた遺伝子組換え型酵素の発現と精製に成功した。さらに、精製蛋白質を抗原として特異性の高い抗体の作製に成功した。
- 8) 覚醒中枢（結節乳頭核）近傍へのPGE2あるいはオレキシンの投与により、ヒスタミン系覚醒中枢の活性化を反映した脳内の遊離ヒスタミン濃度の上昇が観察された。

D. 考察

研究結果（1-3）は、PGD2が前脳基底部のクモ膜に分布するPGD2受容体を介して、アデノシンの細胞外濃度の上昇を起して徐波睡眠を誘発すること、さらに、PGD2が長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要であることを示している。

研究結果（4、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、睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系がより一層整備された。

研究結果（6、7）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合成酵素の阻害剤開発に必要な酵素活性中心の立体構造情報が蓄積した。

研究結果（8）により、内因性覚醒物質であるPGE2やオレキシンは、結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化することが証明された。

E. 結論

PGD2は、前脳基底部のクモ膜に分布するPGD2受容体を介して、細胞外アデノシン濃度の上昇を起して徐波睡眠を誘発する。PGD2は、長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要である。PGE2やオレキシンなどの覚醒作用は、結節乳頭核のヒスタミン神経系の活性化を伴う。小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプの開発と睡眠自動判定ソフトの改良により、睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系が整備された。新しい作用点を持つ睡眠覚醒調節薬として期待されるPGD合成酵素とPGE合成酵素の阻害剤開発に必要な酵素の構造解析を進めた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表（原著・総説）

- 1) Urade, Y. and Hayaishi, O. Prostaglandin D Synthase: Structure and Function. Vitamins and Hormones (Gerald Litwack ed., Academic Press), **58**, 89-120 (2000)
- 2) 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)
- 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. Sci. USA*, 97, 4903-4907 (2000)
 - 4) Gerashchenko, D., Okano, Y., Urade, Y., Inou, S., and Hayaishi, O. Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D2 or adenosine A2a receptor agonist-induced sleep. *J. Sleep Res.* 9, 81-87 (2000)
 - 5) Hayaishi, O. Regulation of sleep by prostaglandin D2 and adenosine. Workshop VIII "The Regulation of Sleep" (Alexander A. Borbory, Osamu Hayaishi, Terrence Sejnowski and Jennifer Altman ed., Human Frontier Science Program, Strasbourg) pp97-103 (2000)
 - 6) Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. *Eur. J. Biochem.*, 267, 3315-3322 (2000)
 - 7) 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.*, 25 (5), 733-738 (2000)
 - 8) Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. Structural Basis of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase Activity Elucidated by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275 (40), 31239-31244 (2000)
 - 9) Kubata, B. K., Duzsenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. Identification of a Novel Prostaglandin F2a Synthase in *Trypanosoma brucei*. *J. Exp. Med.* 192 (9), 1327-1337 (2000)
 - 10) Beuckmann, C. T., Lazarus, M., 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 (b-Trace) in the Central Nervous System of the Adult Rat. *J. Comp. Neurol.* 428, 62-78 (2000)
 - 11) Urade, Y., Hayaishi, O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 259-271 (2000)
2. 学会発表・講演
 - 1) 早石 修 「バイオサイエンス—21世紀の科学」 2000年1月14日、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（岐阜）
 - 2) 早石 修 「Molecular Mechanisms of Sleep-Wake Regulation」 2000年3月16日、Symposium on Frontiers in Biomedical Research、ペンシルバニア大学、フィラデルフィア（アメリカ）
 - 3) 早石 修 「Prostaglandin D2 and Sleep」 2000年6月7日、The 11th International Conference on "Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research-Basic Science and New Clinical Applications"、フローレンス（イタリア）
 - 4) 早石 修 「プロスタグランジンと睡眠」 2000年9月4日、第23回日本神経科学会シンポジウム「睡眠の謎—最近の進歩から」、パシフィコ横浜（神奈川）
 - 5) 早石 修 「Molecular mechanism of sleep promotion by prostaglandin D2」 2000年9月8日、International Congress "Sleep medicine on the eve of the third millennium"、ボローニャ（イタリア）
 - 6) 早石 修 「Molecular mechanisms of sleep-wake regulation」 Invited Lecture、2000年9月11日、パドア大学、パドア（イタリア）
 - 7) 早石 修 「眠りの謎」 2000年10月20日、関西医科大学大学院企画セミナー、関西医科大学（大阪）
 - 8) 早石 修 「睡眠を科学する—睡眠覚醒調節の分子機構—」 2000年11月9日、滋賀医科大学講演、滋賀医科大学（滋賀）
 - 9) 早石 修 「眠りの謎」 2000年12月10日、山口大学、時間学研究所講演会、山口県立図書館レクチャールーム（山口）
 - 10) 早石 修 「眠りの謎」 2000年12月13日、梅澤濱夫記念講演、(財)微生物化学研究所別館（東京）
 - 11) 早石 修 「睡眠を科学する—睡眠覚醒調節の分子機構—」 2001年1月11日、宇宙基地医学研究会 (MERSS) 講演会、東京慈恵会医科大学（東京）
 - 12) 早石 修 「Molecular mechanisms of sleep-wake regulation—a role of prostaglandin D2」 招待講演、2001年1月25日、理化学研究所 脳科学総合研究センター（埼玉）
 - 13) 早石 修 「Unraveling the enigma of sleep—molecular mechanisms of sleep-wake regulation—」 特別講演、2001年1月26日、第6回早石修レクチャー、東京大学山上会館（東京）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠覚醒の分子機構と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

小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発して、睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系を整備した。PGD合成酵素と阻害剤との複合体の結晶化に成功し、睡眠覚醒調節薬として期待されるPGD合成酵素阻害剤の開発に道を開いた。

A. 研究目的

生化学的および分子生物学的手法を用いて、内在性睡眠物質であるPGD₂の合成酵素の立体構造解析を進め、PGD₂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) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発する。
- 2) PGD合成酵素の結晶化条件を改良し、阻害剤との複合体の結晶化を試みる。
- 3) 得られた結晶について、大型放射光施設（Spring-8）を利用したX線結晶回折データの収集を行い、三次元構造を決定する。

C. 研究結果

- 1) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発した。
- 2) PGD合成酵素と阻害剤との複合体の結晶化に成功し、大型放射光施設を利用したX線結晶回折データの収集を開始した。

D. 考察

無線方式自動薬液注入ポンプの開発により、非拘束条件下における遺伝子変異マウスへの薬物投与と睡眠覚醒の同時測定が可能となった。この成果により、睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系がより一層整備された。

PGD合成酵素と阻害剤との複合体のX線結晶構造解析は、睡眠覚醒調節薬として期待されるPGD合成酵素阻害剤の理論的開発に道を開く。

E. 結論

無線方式自動薬液注入ポンプの開発による非拘束マウスへの薬物投与と睡眠覚醒の同時測定系の確立により、睡眠覚醒調節医薬品候補化合物のスクリーニング系がより一層整備された。さらに、PGD合成酵素と阻害剤との複合体のX線結晶構造解析により、本酵素阻害剤の理論的設計が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gerashchenko, D., Okano, Y., Urade, Y., Inoue, S., and Hayaishi, O. Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D₂ or adenosine A_{2a} receptor agonist-induced sleep. *J. Sleep Res.* 9, 81-87, 2000
- 2) Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthases. *Eur. J. Biochem.* 267, 1-9, 2000
- 3) 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.* 25, 733-738, 2000

- 4) Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. Structural basis of hematopoietic prostaglandin D synthase activity elucidated by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 31239-31244, 2000
- 5) Urade, Y., and Hayaishi, O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482, 259-271, 2000
- 6) Beuckmann, C. T., Lazarus, M., 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. *J. Comp. Neurol.* 428, 62-78, 2000.
- 7) Kubata, B.K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. Identification of a novel prostaglandin F2a synthase in *Trypanosoma brucei*. *J. Exp. Med.* 192, 1327-1337, 2000
- 8) Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, N., 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

2. 学会発表

<国際学会>

- 1) Urade, Y. and Hayaishi, O. Structure and function of two distinct types of prostaglandin D synthase. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, June 4-8, Florence (Italy)
- 2) Kubata, B.K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Inui, T., Fujimori, K., Rawer, M., Szallies, A., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. Enzymatic formation of prostaglandin in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and

Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, June 4-8, Florence (Italy)

- 3) Irikura, D., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Uraade, Y., and Hayaishi, O. Crystal structure of lipocalin-type PGD synthase. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, June 4-8, Florence (Italy)
- 4) Okada, T., Mochizukii, T., Sugita, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. Characterization of Prostaglandin D2-induced Adenosine Increase in the Subarachnoid Space of Rats, 2000 annual meeting, New Orleans, Nov. 4-9, 2000
- 5) Urade, Y. Molecular mechanism of sleep induced by prostaglandin D2. 3rd Asian Sleep Research Society Congress, Thailand, Dec. 4, 2000

<国内学会>

- 1) 裏出良博, 江口直美, 金岡禎秀, 桑幡裕子, Pizar, E. I., 乾 隆, 早石 修「ヒト型プロスタグランジン合成酵素トランスジェニックマウスの睡眠異常」第 23 回日本神経科学大会, 9 月 4-6 日, 横浜
- 2) 裏出良博, 江口直美, 金岡禎秀, 桑幡裕子, Pinzar, E., 乾 隆, 早石 修「ヒト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睡眠異常」第 23 回日本神経科学大会, 9 月 4-6 日, 横浜
- 3) 大久保忠恭, 乾 隆, 恵美真以子, 早石 修, 裏出良博「リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の低濃度変性剤による活性化」生物物理学会, 9 月 10-13 日, 仙台
- 4) 裏出良博「プロスタグランジン D2 による睡眠誘発の分子機構」第 73 回日本生化学会大会, 10 月 11-14 日, 横浜
- 5) 堀井俊宏, Z. Kabututu, 三田村俊秀, 山下幸和, B.K. Kubata, 江口直美, 早石 修, 裏出良博「脳性マラリアとプロスタグランジン合成」第 73 回日本生化学会大会, 10 月 11-14 27. 岡田哲也, 望月貴年, 杉田義郎, 裏出良博, 早石 修「ラット脳膜におけるアデノシンデアミナーゼの発現」第 23 回分子生物学会, 12 月 13-16 日, 神戸

<招待講演>

- 1) 裏出良博「睡眠覚醒リズムの分子機構」第 35 回脳のシンポジウム, 3 月 10 日, 札幌

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠覚醒の分子機構と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

PGD₂の脳室内投与により、野生型マウスでは徐波睡眠の選択的な増加が起きるが、PGD₂受容体遺伝子欠損マウスでは睡眠誘発が起きないことを見出した。PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびPGD₂受容体遺伝子欠損マウスは断眠による睡眠要求の蓄積が起り難いことを見出した。従って、PGD₂は前脳基底部のクモ膜に分布するPGD₂受容体を介して徐波睡眠を誘発し、長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要であると考えられる。

A. 研究目的

PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびPGD₂受容体遺伝子欠損マウスを用いて、内在性睡眠調節物質であるPGD₂の睡眠誘発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) 無麻酔下のマウス脳室への薬物投与と睡眠覚醒の同時測定法を開発し、PGD合成酵素遺伝子欠損マウスとPGD₂受容体遺伝子欠損マウスに応用する。

2) 動物睡眠自動判定ソフトを改良し、睡眠判定データの編集速度を向上させる。

C. 研究結果

1) マウス脳室へのPGD₂投与により、徐波睡眠の選択的な増加が起きるが、PGD₂受容体遺伝子欠損マウスでは、PGD₂の脳室内投与による睡眠誘発が起きないことを見出した。

2) PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびPGD₂受容体遺伝子欠損マウスは断眠による睡眠要求の蓄積が起り難いことを発見した。

3) 動物睡眠自動判定ソフトに睡眠判定アルゴリズムの自己学習機構を組み込んだ。

D. 考察

研究結果(1)により、PGD₂による睡眠誘発情報は、前脳基底部分布細胞のPGD₂受容体を介して、脳内に伝達されることが考えられる。研究結果(2)により、PGD₂は、長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要であると考えられる。研究結果(3)により、マウスの睡眠判定データの編集速度を大幅に向上させることができる。

E. 結論

PGD₂は、前脳基底部分布細胞のクモ膜に分布するPGD₂受容体を介して徐波睡眠を誘発する。PGD₂は、長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要である。マウスの睡眠解析ソフトの改良により、睡眠覚醒調節医薬品の有効性測定が迅速に行える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiraoka, A., Seiki, K., Oda, H., Eguichi, 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. Biosci.* 23, 110-116, 2000
- 2) 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
 - 3) Manya, 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
 - 4) Garcia-Fernandez, L.F., Iztueta, M.A., Eguchi, N., Fresno, M., Urade, Y., and Muz, A. Dexamethasone induces lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression in mouse neuronal cells. *J. Neurochem.* 75, 460-470, 2000
 - 5) 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.* 21, 848-854, 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, N., 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
- 3) Eguchi, N., Mizoguchi, A., Gerashchenko, D., Murayama, K., Urade, Y., and Hayaishi, O. Cellular localization of prostaglandin D receptor in the brain of mice and rats. Society for Neuroscience, 2000 Annual Meeting, New Orleans, Nov. 4-9, 2000
 - 4) Eguchi, N. Sleep of gene-knockout and transgenic mice for prostaglandin D synthase. Asian Sleep Research Society Congress, Thailand, Dec. 4, 2000
- <国内学会>
- 1) 江口直美, 溝口 明, Gerashchenko, D., 裏出良博, 早石 修「マウス・ラット脳におけるプロスタグランジン D₂ 受容体の細胞局在」日本睡眠学会第 25 回学術集会, 6 月 8-9 日, 横浜
 - 2) 桑幡裕子, 江口直美, 望月貴年, 恵美真以子, 乾隆, 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睡眠調節異常について」日本睡眠学会第 25 回学術集会, 6 月 8-9 日, 横浜
 - 3) 江口直美, 桑幡裕子, 乾隆, 畑毛一枝, 裏出良博, 早石 修「内因性睡眠誘発物質プロスタグランジン D₂ の合成酵素遺伝子欠損マウスの睡眠異常」第 23 回日本神経科学大会, 9 月 4-6 日, 横浜
 - 4) 江口直美, Pinzar, E., 桑幡裕子, 乾隆, 裏出良博, 早石 修「プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子変異マウスの睡眠解析」第 73 回日本生化学会大会, 10 月 11-14 日, 横浜
 - 5) 桑幡裕子, 江口直美, 望月貴年, 岡崎一枝, 恵美真以子, 乾隆, 魚留信子, 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睡眠調節異常」第 73 回日本生化学会大会, 10 月 11-14 日, 横浜

2. 学会発表

<国際学会>

- 1) Eguchi, N., Mizoguchi, A., Kimura, K., Kiyohara, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y., and Hayaishi, O. Cellular localization of prostaglandin D receptor in mouse brain. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, June 4-8, Florence (Italy)
- 2) Urade, Y., Pinzar, E., Kanaoka, Y., Inui, T., Eguchi, N., and Hayaishi, O. Sleep induction after tail clipping in human prostaglandin D synthase-transgenic mice. Society for Neuroscience, 2000 Annual Meeting, New Orleans, Nov. 4-9, 2000

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠覚醒の分子機構と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

マウス前脳基底部のクモ膜下腔へのPGD₂投与により細胞外アデノシン濃度が上昇するが、PGD₂受容体遺伝子欠損マウスでは、その上昇が起きない。従って、PGD₂は前脳基底部分クモ膜下腔のアデノシンを増加させ睡眠を誘発すると考えられる。

A. 研究目的

内在性睡眠調節物質であるPGD₂とアデノシンの作用機構に関する知識を深め、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

ウレタン麻酔下のマウス前脳基底部分への微量脳内透析プローブの埋め込みを行い、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学的に検討した。

C. 研究結果

マウス前脳基底部分のクモ膜下腔において、PGD₂投与による細胞外アデノシン濃度の上昇が起きるが、PGD₂受容体遺伝子欠損マウスでは、その上昇が起きないことを見出した。

D. 考察

PGD₂は、前脳基底部分のクモ膜に分布するPGD₂受容体を介して局所のアデノシンの細胞外濃度の上昇させ、徐波睡眠を誘発すると考えられる。

E. 結論

PGD₂は前脳基底部分クモ膜下腔のアデノシンを増加させ睡眠を誘発する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jansen F.P., Mochizuki T., Maeyama K., Leurs R. and Timmerman H. Characterization of histamine H₃ receptors in mouse brain using the H₃ antagonist [¹²⁵I]iodophenpropit. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 60-67, 2000.
- 2) Mochizuki T., Huang Z-L., Okada T., Urade Y. and Hayaishi O. Characterization of prostaglandin D₂-induced adenosine increase in the subarachnoid space of rats. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **26**, 2, 1515, 2000.

2. 学会発表

- 1) Mochizuki, T., Huang, Z.-L., Okada, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. Characterization of prostaglandin D₂-induced adenosine increase in the subarachnoid space of rats. Society for Neuroscience, 2000 Annual Meeting, New Orleans, Nov. 4-9, 2000
- 2) 望月貴年, 岡田哲也, 裏出良博, 早石修「プロスタグランジンD₂によるラット吻側前脳基底部分くも膜下腔のアデノシン調節機構について」日本睡眠学会第25回学術集会, 6月8-9日, 横浜
- 3) 望月貴年, 黄志力, 岡田哲也, 裏出良博, 早石修「プロスタグランジンD₂によるラット吻側前脳基底部分くも膜下腔のアデノシン調節機構」第23回日本神経科学大会, 9月4-6日, 横浜

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 黄 志力（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 受託研究員

研究要旨

覚醒調節物質であるPGE₂とオレキシンは、結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化することにより、覚醒作用を示す可能性が示された。この結果は、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発に有効である。

A. 研究目的

覚醒の内在性調節物質であるPGE₂、オレキシン、および、ヒスタミンの作用機構に関する知識を深め、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。

内因性覚醒物質であるPGE₂やオレキシンは、結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化する。

F. 健康危険情報

特になし

B. 研究方法

ラットの覚醒中枢（結節乳頭核）に微量脳内透析プローブを埋め込み、PGE₂、EP₄型受容体作動薬、あるいは、オレキシンを投与して、脳内の遊離ヒスタミン濃度を測定する。

G. 研究発表

1. 学会発表

1) Huang, Z.-L., Mochizuki, T., Okada, T., Yamatodani, A., Urade, Y., and Hayaishi, O. Application of prostaglandin in E₂ to the tuberomammillary nucleus activates histaminergic system in the rat brain. Society for Neuroscience, 2000 Annual Meeting, New Orleans, Nov. 4-9, 2000

2) Huang, Z.-L., Mochizuki, T., Okada, T., Yamatodani, A., Urade, Y., and Hayaishi, O. Prostaglandin E₂ activates histaminergic system in the rat brain. 日本睡眠学会第25回学術集会, 6月8-9日, 横浜

3) 黄 志力, 望月貴年, 岡田哲也, 大和谷 厚, 裏出良博, 早石 修 "Application of prostaglandin E₂ to the tuberomammillary nucleus activates the central histaminergic system of rats"第23回日本神経科学大会, 9月4-6日, 横浜

C. 研究結果

覚醒中枢（結節乳頭核）近傍へのPGE₂あるいはEP₄型受容体作動薬の投与により、脳内の遊離ヒスタミン濃度の上昇が観察された。

さらに、ナルコレプシーの原因物質であるオレキシンの投与は、強力な覚醒誘発を引き起こし、PGE₂と同様に、脳内の遊離ヒスタミン濃度の上昇を伴った。

D. 考察

内因性覚醒物質であるPGE₂は、EP₄型受容体を介して結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化。そして、オレキシンも、ヒスタミン神経系を活性化することにより、強力な覚醒誘発を引き起こすと考えられる。

E. 結論

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 Michael Lazarus（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 受託研究員

研究要旨

内因性覚醒物質であるPGE₂の生合成に関する理解を進めるため、小胞体膜結合型PGE合成酵素のcDNAを単離し、大腸菌を用いた遺伝子組換え型酵素の発現を行い、さらに、精製蛋白質を抗原として特異性の高い抗体を作製した。

A. 研究目的

生化学的および分子生物学的手法を用いて、内因性覚醒物質であるPGE₂の生合成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

小胞体膜結合型PGE合成酵素のcDNAを単離し、遺伝子組換え型酵素の発現と精製を行う。

C. 研究結果

小胞体膜結合型PGE合成酵素cDNAを単離し、大腸菌を用いた遺伝子組換え型酵素の発現と精製に成功した。さらに、精製蛋白質を抗原として特異性の高い抗体の作製に成功した。

D. 考察

小胞体膜結合型PGE合成酵素は、現在までに報告されている様々なPGE合成酵素の中で、最も比活性の高い酵素であることが明らかになった。又、得られた抗体は、市販の部分配列特異的抗体と比較して、特異性の非常に高い抗体であることが判明した。

E. 結論

PGE₂の生産を調整することにより睡眠覚醒を調整するPGE合成酵素の阻害剤開発に必要な酵素の一次構造が明らかになり、その脳内分布の同定に必要な特異性の高い抗体が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Beuckmann C.T., Lazarus M., Gerashchenko D., Mizoguchi A., Nomura S., Mohri I., Uesugi A., Kaneko T., Mizuno N., Hayaishi O., Urade Y., "Cellular Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase(β -trace) in the central nervous system of the adult rat". J. Comp. Neurol. 428, 62-78, 2000

2. 学会発表

1) Lazarus, M., 藤谷靖志, 早石 修, 裏出良博
「Expression and regulation of microsomal glutathione-dependent prostaglandin E synthase in mouse tissues and murine macrophages.」日本免疫学会, 11月14-16日, 仙台

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Urade, Y. and Hayaishi, O.	Prostaglandin D Synthase: Structure and Function.	Gerald Litwack	Vitamins and Hormones (58)	Academic Press	New York	2000	89-120
Hayaishi, O.	Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: a role of prostaglandin D2.	S.Zeki F.R.S.	Philosophical Transactions : Biological Sciences (355)	The Royal Society	London	2000	275-280
Hayaishi, O.	Regulation of sleep by prostaglandin D2 and adenosine	Alexander A. Borb y, Osamu Hayaishi, Terrence Sejnowski and Jennifer Altman	Workshop VIII "The Regulation of Sleep"	Human Frontier Science Program	Strasb ourg	2000	97-103

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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. Sci. USA,	97	4903-4907	2000
Gerashchenko, D., Okano, Y., Urade, Y., Inou, S., and Hayaishi, O.	Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D2-or adenosine A2a receptor agonist-induced sleep.	J. Sleep Res	9	81-87	2000
Kanaoka, Y., Fujimori, K., Kikuno, R., Sakaguchi, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.	Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase.	Eur. J. Biochem	267	3315-3322	2000
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.	25	733-738	2000
Pinzar, E., Miyano, M., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.	Structural Basis of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase Activity Elucidated by Site-directed Mutagenesis.	J. Biol. Chem	275	31239-31244	2000
Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O.	Identification of a Novel Prostaglandin F2a Synthase in <i>Trypanosoma brucei</i> .	J. Exp. Med.	192	1327-1337	2000
Beuckmann, C. T., Lazarus, M., 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 (b-Trace) in the Central Nervous System of the Adult Rat.	J. Comp. Neurol.	428	62-78	2000
Urade, Y., Hayaishi, O.	Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin prostaglandin D synthase.	Biochim. Biophys. Acta	1482	259-271	2000

20000462

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。