

(財)大阪バイオサイエンス研究所第2研究部 研究部長

裏出 良博

「脳膜神経相関の分子機構」

1. 研究実施の概要

脳膜(くも膜)は脳や脊髄などの中枢神経系を取り囲む薄い膜状の組織であり、従来は、脳を物理的に保護し中枢神経系と末梢組織を隔てる単なる支持被膜であるとされていた。しかし、我々は、内因性睡眠物質であるプロスタグランジン(PG) D_2 の生合成を司るリポカリン型 PGD 合成酵素が、脳膜において活発に産生され、ヒト脳脊髄液の主要蛋白質として1960年に発見されて以来その機能や構造および産生場所が不明であった謎の蛋白質 β トレースとして脳脊髄液に分泌されることを発見した。この研究結果は「脳膜と中枢神経系は脳脊髄液を介して密接な情報交換を行い、相互の機能維持に積極的に関わる」ことを示している。そこで、我々は脳膜による中枢神経系の恒常性の維持機構を分子レベルで明らかにすることを目的として本研究を行った。

我々は、脳膜神経関連の鍵を握る分子として睡眠物質としての PGD $_2$ とその生合成系と情報伝達系に着目して研究を開始した。PGD 合成酵素には、進化的起源の異なるリポカリン型と造血器型の2種類の酵素が存在する。これらの2種類の酵素について、遺伝子組換え蛋白質を用いた結晶化に成功し、それぞれ2.1と1.2Å分解能のX線結晶構造を決定した。その結果、両酵素の全体構造は全く異なるが活性中心の構造は極めて類似していることが判明した。この結果は、両酵素が異なった起源から同じ触媒機能を獲得した「機能的相似」の一例であることを構造学的に証明している。これらの結晶座標は、両酵素の選択的阻害剤の分子設計の鋳型として極めて有効であり、我々は既にそれぞれの酵素に特異的な阻害剤リード化合物を見出し、一部の化合物については、ヒト型酵素トランスジェニック(TG)マウスを用いて、経口投与での有効性を確認した。さらに、両酵素遺伝子について、遺伝子ノックアウト(KO)マウスとヒト型酵素を大量発現するTGマウスを作製して、これらの遺伝子操作マウスの機能解析を行った。

分子進化の解析結果により、リポカリン型 PGD 合成酵素は脂溶性物質の輸送蛋白質リポカリンから進化した唯一の酵素蛋白質であると考えられる。また、本酵素は反応産物である PGD $_2$ やレチノイド、甲状腺ホルモン等の脂溶性生理活性物質、あるいは、ビリルビンやビリベルジン等の組織障害性疎水性低分子物質を高親和性(K d = 30 - 500 nM)に結合する。従って、本酵素は内因性睡眠物質である PGD $_2$ の合成酵素として機能すると同時に、PGD $_2$ やレチノイド等の輸送蛋白質、あるいは、組織障害性の脂溶性物質の捕捉蛋白質としての機能を併せ持つ多機能蛋白質であると考えられる。

リポカリン型 PGD 合成酵素は、脳脊髄を囲むくも膜とミエリンの生成と維持に関与するオリゴデンドログリアにおいて活発に合成された後、 β トレースとして脳脊髄液に分泌される。そして、遺伝性脱髄疾患クラベ病のモデル動物である Twitcher マウスや、多発性硬化症やアルツハイマー病を含む多くの神経変性疾患の患者の脳内において本酵素の発現が昂進していることが明らかになった。各種の脳疾患患者の脳脊髄液 β トレース濃度を測定した結果、くも膜下出血患者では、発症2-3日後その濃度が2倍以上に上昇し、その時点の脳脊髄液より精製した本酵素にヘムの分解産物であるビリベルジンが結合していること

を見出した。これらの結果は、脳内出血に伴い脳内で産生するヘム分解物の排泄蛋白質として本酵素が機能する可能性を示している。以上の仮説に基づき、脳内出血を伴う疾患の予後改善やヘム分解物の過剰蓄積が原因である新生児黄疸の症状改善を目標とした本酵素蛋白質（ β トレース）の補充療法についての検討を進めている。さらに、正常圧水頭症患者の脳脊髄液 β トレース濃度が、正常群や痴呆性疾患群の50~70%に低下することを見出した。正常圧水頭症はシャント手術により痴呆から回復するので脳脊髄液の循環障害による疾患と考えられているが、現在でも有効な術前診断法が無い。従って、脳脊髄液 β トレース濃度は、正常圧水頭症の術前診断法として、初めての実用的マーカーである。

又、ラットやマウスと異なり、ヒトのリポカリン型 PGD 合成酵素（ β トレース）は、心臓や冠動脈の動脈硬化巣で活発に生産され、血液中に分泌される。そして、腎疾患患者の尿中には高濃度の本酵素が検出される。そこで、血中および尿中の本酵素濃度と動脈硬化および腎疾患との相関を調べた。その結果、安定狭心症患者において冠動脈の硬化巣の体積と末梢血の本酵素濃度が相関することを見出した。さらに、2型糖尿病患者では、尿中アルブミンの排泄量が正常値を示す患者群においても、腎機能の低下に伴い尿中の本酵素濃度が上昇することを見出した。従って、血中および尿中の本酵素濃度の測定は、動脈硬化および腎疾患の新たな診断法として期待される。

一方の造血器型 PGD 合成酵素は、肥満細胞や Th2 リンパ球、および、神経系の発達の初期にでも膜から脳実質へ移行するミクログリアに存在し、免疫反応やアレルギー性炎症反応に関与すると考えられる。本酵素は、酵素反応に還元型グルタチオンを絶対的に要求し、アミノ酸配列の比較から脊椎動物では最初に同定されたシグマ型のグルタチオン転移酵素である。本酵素もリポカリン型酵素と同様に、遺伝性や自己免疫疾患モデルの脱髄マウス、および、各種の神経変性疾患の患者の脳内において発現が昂進していることが明らかになった。さらに、外傷性の脳損傷モデル実験において、傷害局所に集積するマクロファージや周辺のマクログリアで本酵素の誘導が起り、さらにその周辺の活性化されたアストログリアに DP 受容体（PGD₂受容体の一種）の誘導が起きる事を発見した。そして、造血器型 PGD 合成酵素 KO マウスを用いて脳損傷モデル実験を行なうと、脳損傷の拡大が軽度であり回復が早い。又、造血器型 PGD 合成酵素阻害剤や DP 受容体アンタゴニストの投与は、野生型マウスの外傷性脳損傷の拡大を抑制し回復を促進した。従って、これらの薬剤は、各種の中樞神経疾患の治療薬としての開発が期待される。我々の作製したヒト型の本酵素の結晶構造とヒト造血器型 PGD 合成酵素を大量発現する TG マウスは、医薬品リード化合物としての阻害剤開発に極めて有効である。

リポカリン型 PGD 合成酵素 KO マウスは、痛覚反応の異常（接触性アロディニアの消失）などの様々な中枢性の機能異常を示すことが明らかになり、本酵素により生成されて DP 受容体により感知される PGD₂ が、脳膜神経相関の介在物質として機能することが実証された。たとえば、リポカリン型 PGD 合成酵素 KO マウスと DP 受容体 KO マウスは、共に、断眠による睡眠不足を補うために断眠解除後に起きる過剰なノンレム睡眠（熟睡時の睡眠）

を示さない。従って、PGD₂は睡眠不足を補ってその恒常性を維持するための睡眠物質として機能すると考えられる。さらに、ヒトのリポカリン型 PGD 合成酵素を大量発現する TG マウスが、尾先端の切断の痛覚刺激により、一過性（約 6 時間）のノンレム睡眠の増加を示し、その睡眠発作は脳内 PGD₂ の上昇を伴うことを発見した。これは世界で初めて作製されたノンレム睡眠の異常マウスであり、異常な眠気を抑制する薬剤としてのリポカリン型 PGD 合成酵素阻害剤のスクリーニングに有効な動物モデルである。

睡眠物質としての PGD₂の情報伝達系に関する研究を進め、以下のような睡眠覚醒調節系の概略を明らかにすることができた。くも膜やオリゴデンドログリアに局在するリポカリン型 PGD 合成酵素により生産された PGD₂は、本酵素(βトレース)に結合した状態で、睡眠ホルモンとして脳脊髄液を循環する。その後、前脳基底部のくも膜に局在する DP 受容体を刺激し、その局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させる。アデノシンは前脳基底部のドーパミン神経系に分布するアデノシン A_{2A}受容体を刺激する。この受容体はカフェインによる不眠の標的分子と考えられる。そして、その刺激は前部視床下部に存在する睡眠中枢（腹側外側視索前野：VLPO）の神経を活性化し、GABA あるいはガラニン性の抑制性神経投射を介して、後部視床下部に存在するヒスタミン性覚醒中枢（結節乳頭核：TMN）の活動を抑制して、脳全体をノンレム睡眠状態に導く。この情報伝達系には、アデノシン以外にも、従来より睡眠覚醒調節に関係が深いと考えられて来た様々な物質が含まれる。ベンゾジアゼピン系眠剤の標的分子と考えられる GABA 受容体や風邪薬や抗アレルギー薬（ヒスタミン H1 ブロッカー）の服用による眠気と関係するヒスタミン H1 受容体などである。現在、我々は、これらの受容体遺伝子 KO マウスの睡眠覚醒調節の異常について、統一的な解析を進めている。その研究成果は、現在も未解決の睡眠覚醒の調節系の全容を解明し、我々が持つ内因性の調節系を利用した自然な睡眠をもたらす睡眠薬や居眠り防止薬の開発に繋がる。

さらに、我々の研究により、PGD 合成酵素以外にも、様々な酵素蛋白質（シクロオキシゲナーゼ・ホスホリパーゼ Cβ4・アデノシンデアミナーゼ）や受容体（DP 受容体）が脳膜に局在することや、くも膜培養細胞が、様々な神経栄養因子を分泌することが明らかになった。従って、脳膜と中枢神経系は、脳脊髄液を介して密接な情報交換を行ない、相互の機能維持に積極的に関与していると予想される。本研究により同定された脳膜由来の神経調節因子・分化促進因子・神経死誘導因子とそれらの受容体の作用機構を分子レベルで解明することにより、それらの機能不全による疾患に対する新たな予防法や治療法の開発が期待される。

2. 研究構想

我々は、脳膜神経相関の鍵を握る分子として、睡眠物質としての PGD₂の生合成を担うと考えられるリポカリン型 PGD 合成酵素に注目して研究を開始した。本酵素は、くも膜において極めて活発に合成され、ヒト脳脊髄液の総蛋白質の約 5-10%をしめる βトレースと

して脳脊髄液に分泌される。PGD 合成酵素の基質である PGH₂を合成するシクロオキシゲナーゼは、ミクロソーム画分に回収される膜結合型酵素であり、細胞内の粗面小胞体(ER)や核外膜に局在する。そして、PGH₂は水溶液中では極めて不安定な分子内過酸化結合を持ち、約5分の半減期で主に PGE₂に分解する。従って、ER や核外膜に局在するリポカリン型 PGD 合成酵素は基質である PGH₂の供給を受けられるが、細胞外へ分泌された後では酵素として機能することが困難である。ヒト脳脊髄液の総蛋白質の約5-10%をしめる本酵素(βトレース)の役割は何なのか、我々は、なぜこれほど多量の本酵素蛋白質をくも膜で産生して脳脊髄液に分泌するのか。これらの解答を得るため、

本酵素の構造解析と疎水性リガンドの結合実験

本酵素の細胞分布と遺伝子発現、および、体内動態

本酵素遺伝子欠損マウスの睡眠調節機能の解析

各種の中樞神経疾患と本酵素の遺伝子発現と脳脊髄液濃度変化

これらのアプローチを、大阪バイオサイエンス研究所の分子行動グループを中心として進めた。研究の進展により平成11年3月にてヒト髄膜腫によるリポカリン型 PGD 合成酵素の分泌機構の解明とヒト脳脊髄液におけるβトレース濃度変化の追跡を担当していた脳神経科学グループ(金沢大学)との共同研究を終了し、江口博士の大阪バイオサイエンス研究所副部長着任に伴い、平成11年度よりリポカリン型 PGD 合成酵素遺伝子欠損マウスの行動解析と DP 受容体の脳内分布の解析を担当していたシグナル伝達グループ(京都大学)を分子行動グループに統合した。さらに、平成13年9月30日にて培養くも膜細胞を用いたリポカリン型 PGD 合成酵素の遺伝子発現機構の解析と各種の細胞成長因子および分化促進因子の単離と同定を担当した細胞生理グループ(群馬大学)との共同研究を終了し、最終年度は、分子行動グループに集中して PGD 合成酵素、βトレース、脳膜あるいは脳脊髄液に関する研究を継続した。

五年間の研究により、リポカリン型 PGD 合成酵素に関する当初の研究目標はほぼ達成され、本酵素のX線結晶構造も決定できた。さらに、現在、本酵素阻害剤との複合体のX線結晶構造も進んでいる。そして、リポカリン型 PGD 合成酵素 KO マウスの脳内 PGD₂生合成活性が、野生型マウスの約50%程度にしか低下しないという予想外の結果から、造血器型 PGD 合成酵素の脳内分布がクローズアップされ、造血器型 PGD 合成酵素がミクログリア細胞に分布し、外傷性脳損傷や様々な神経変性疾患の進展に関与する可能性が明らかになった。造血器型 PGD 合成酵素のX線結晶構造は、リポカリン型酵素に先行して行ない、既に、経口投与による有効性を確認した阻害剤 HQL-79 とヒト酵素との複合体の高分解能(1.2Å分解能)の座標が決定できた。これらの研究により、我々は期せずして、進化的に異なる起源(リポカリンとグルタチオン転移酵素)から進化して同一の触媒機能を獲得したと考えられる2種類の PGD 合成酵素の機能的相似を結晶構造学的に実証することができた。極めて幸運であった。

そして、中樞神経疾患と脳脊髄液βトレースの相関の追跡から、くも膜下出血後の脳脊

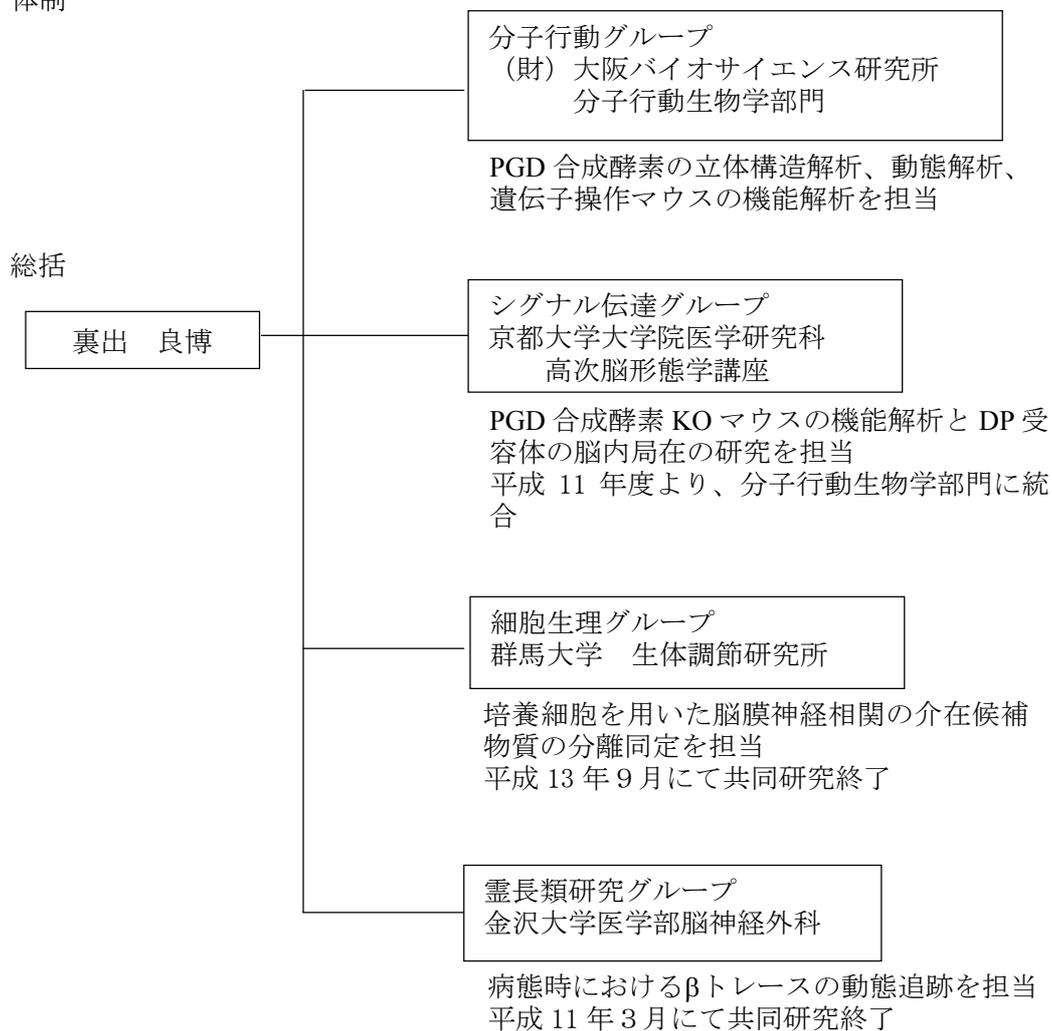
髄液βトレースが緑色の色素を結合していることを発見し、本酵素がビリルビンやビリベ
ルジンを高親和性に結合することを突き止めた。さらに、正常圧水頭症の術前診断として
の可能性も、多くの臨床医の協力により見いだされた研究成果である。彼等との共同研究
の中で、リポカリン型 PGD 合成酵素の遺伝子発現が、ラット、マウスとヒトでは大きく異
なり、ヒトでは心臓や冠状動脈の動脈硬化巣においても本酵素の発現が活発であり、さら
に血液に分泌されることが発見され、動脈硬化のバイオマーカーとしての応用の可能性が
開かれた。現在も、多数の病院の協力を得たマルチセンター方式で動脈硬化のバイオマ
ーカーとしての本酵素の利用に関する研究を進めている。

リポカリン型 PGD 合成酵素 KO マウスは、痛覚反応の異常(接触性アロディニアの消失)、
断眠による睡眠要求蓄積の低下などの様々な中枢性の機能異常を示すことが証明できた。
これらの研究成果は、動物行動学的な解析の方法論の開発の上に成立したものである。特
に、解析方法の遅れていた動物脳波の周波数解析に基く睡眠バイオアッセイ・ソフトの開
発や、非拘束条件下での遺伝子操作マウスの脳内への薬液の持続注入実験法の開発は、今
後の遺伝子操作マウスの行動解析の基本的な実験手段として利用される成果である。

さらに、我々の研究により、リポカリン型 PGD 合成酵素以外にも、様々な酵素蛋白質(シ
クロオキシゲナーゼ・ホスホリパーゼ Cβ4・アデノシンデアミナーゼ) や受容体 (DP 受
容体) が脳膜に局在することや、くも膜培養細胞が、様々な神経栄養因子を分泌するこ
とが明らかになった。従って、脳膜系は、当初の予想以上に密接に且つ積極的に脳脊髄液を
介して中枢神経系の機能維持に関与していると予想される。しかし、現在も、くも膜や脳
脊髄液が果たす脳の機能維持機構に注目している研究者は世界的に少なく、我々がこの分
野の世界のトップチームである。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2000年 10月12日	第73回日本生化学会大会 シンポジウム：睡眠の分子機構	パシフィコ 横浜	100名	裏出良博（大阪バイオサイエンス研究所）、江口直美（大阪バイオサイエンス研究所）、北浜邦夫（Universite Claude Bernard）、角谷寛（Stanford University）、柳沢正史（The University of Texas）がシンポジストとして参加し、内因性睡眠物質として認定されたプロスタグランジン D ₂ とナルコレプシーの原因物質と同定されたオレキシンに関する研究成果を中心に睡眠の分子機構に関する最新の研究成果が紹介された。
2001年 9月26日	第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 シンポジウム：21世紀の睡眠研究	国立京都国際会館	250名	裏出良博（大阪バイオサイエンス研究所）、桜井武（筑波大学）、ヘンシュ貴雄（理化学研究所）、Mignot Emanuel（Stanford University）、Tobler Irene（University of Zurich）、Robert McCarley（Harvard University）がシンポジストとして参加し、21世紀に向けての、睡眠物質や遺伝子操作等の最新の概念や実験技術を導入して行なわれている睡眠覚醒の調節機構に関する最先端の研究成果が紹介された。

5. 主な研究成果

(1) 論文発表

原著論文

1. Caria MA, Kaneko T, Kimura A, Asanuma H: Functional organization of the projection from area 2 to area 4g in the cat. *J.Neurophysiol.*, 77, 3107-3114 (1997)
2. Chen J, Koyama N, Kaneko T, Mizuno N: The locus coeruleus of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) does not express μ -opioid receptor-like immunoreactivity. *Brain Res.*, 755, 326-330 (1997)
3. Dieter P, Ambs P, Fitzke E, Creminon C, Maclouf J, Kanaoka Y, Urade Y: Arachidonic acid cascade in kupffer cells. *Cells Hepatic Sinusoid*, 6, 355-356 (1997)
4. Eguchi Y, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Kijima Y, Matsu-ura Y, Urade Y, Hayaishi O: Expression

- of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *PNAS*, 94, 14689-14694 (1997)
5. Garcia-Fernandez LF, Rausell E, Urade Y, Hayaishi O, Bernal J, Munoz A: Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D₂ synthase/beta trace in specific areas of the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 1566-1573 (1997)
 6. Gong LW, Ding YQ, Wang D, Zheng HX, Qin BZ, Li JS, Kaneko T, Mizuno N: GABAergic synapses on μ -opioid receptor-expressing neurons in the superficial dorsal horn: an electron microscope study in the cat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 227, 33-36 (1997)
 7. Hasegawa, M, Yamashima, T, Kida, S, Yamashita, J: Membranous ultrastructure of human arachnoid cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56, 1217-1227 (1997)
 8. Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, Eguchi N, Oda H, Urade Y: Analysis of low-molecular-mass proteins in cerebrospinal fluid by sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis. *J. Chromatogr B. Biomed. Sci. Appl.*, 697, 141-147 (1997)
 9. Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O: Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, 90, 1085-1095 (1997)
 10. Lee T, Kaneko T, Taki K, Mizuno N: Preprodynorphin-, preproenkephalin-, and preprotachykinin-expressing neurons in the rat neostriatum: An analysis by immunocytochemistry and retrograde tracing. *J. Comp. Neurol.* 386, 229-244 (1997)
 11. Lee T, Kaneko T, Shigemoto R, Mizuno N: Collateral projections from striatonigral neurons to substance P receptor-expressing intrinsic neurons in the striatum of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 388, 250-264 (1997)
 12. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N: Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 378, 283-294 (1997)
 13. Li JL, Kaneko T, Nomura S, Li YQ, Mizuno N: Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 384, 127-141 (1997)
 14. Mahmud I, Ueda N, Yamaguchi H, Yamashita R, Yamamoto S, Kanaoka Y, Urade Y, Hayaishi O: Prostaglandin D synthase in human megakaryoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28263-28266 (1997)
 15. Seto, A, Hasegawa, M, Uchiyama, N, Yamashima, T, Yamashita J: Alteration of E-cadherin and alpha N-catenin immunoreactivity in the mouse spinal cord following peripheral axotomy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1182-1190 (1997)
 16. Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayaishi O: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 15789-15795 (1997)
 17. Urade Y: [New aspects on prostaglandin D synthases]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 110 Suppl 1, 56P-58P (1997)
 18. Yamashima T, Sakuda K, Tohma Y, Yamashita J, Oda H, Irikura D, Eguchi N, Beuckmann CT, Kanaoka Y, Urade Y, Hayaishi O: Prostaglandin D synthase (beta-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)

19. Fujitani Y, Urade Y, Hayaishi O: [Sleep-promoting substances]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 35, 811-816 (1998)
20. Garcia-Fernandez LF, Urade Y, Hayaishi O, Bernal J, Munoz A: Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 321-330 (1998)
21. Gerashchenko DY, Beuckmann CT, Kanaoka Y, Eguchi N, Gordon WC, Urade Y, Bazan NG, 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)
22. Gerashchenko DY, Beuckmann CT, Marcheselli VL, Gordon WC, Kanaoka Y, Eguchi N, Urade Y, Hayaishi O, Bazan NG: Localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in iris, ciliary body, and eye fluids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39, 198-203 (1998)
23. Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ: Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.* 58, 826-833 (1998)
24. Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, Eguchi N, Oda H, Urade Y: Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of beta-trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J. Chromatogr A*, 802, 143-148 (1998)
25. Kabeya K, Ishikawa K, Katakai K, Watanabe M, Ohe Y, Wakabayashi K, Mori M: Prostaglandin-D-synthase (beta-trace protein) levels in rat cerebrospinal fluid. *Neuroreport*, 9, 915-919 (1998)
26. Kaneko T, Murashima M, Lee T, Mizuno N: Characterization of neocortical non-pyramidal neurons expressing preprotachykinins A and B: a double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience*, 86, 765-781 (1998)
27. Kilunga Kubata B, Eguchi N, Urade Y, Yamashita K, Mitamura T, Tai K, Hayaishi O, Horii T: *Plasmodium falciparum* produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans. *J. Exp. Med.*, 188, 1197-1202(1998)
28. Kilunga Kubata B, Eguchi N, Urade Y, Yamashita K, Horii T, Hayaishi O: Evidence of prostaglandin production by the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *S. Afr. J. Sci.*, 94, 285-286 (1998)
29. Scammell T, Gerashchenko DY, Urade Y, Onoe H, Saper C, Hayaishi O: Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂. *PNAS*, 95, 7754-7759 (1998)
30. Tokugawa Y, Kunishige I, Kubota Y, Shimoya K, Nobunaga T, Kimura T, Saji F, Murata Y, Eguchi N, Oda H, Urade Y, Hayaishi O: Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 58, 600-607 (1998)
31. Urade Y: [Gene engineering studies on sleep]. *Nippon Rinsho*, 56, 488-492 (1998)
32. Beuckmann CT, Urade Y, Hayaishi O: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) binds non-substrate lipophilic ligands. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 469, 55-60(1999)
33. Beuckmann CT, Aoyagi M, Okazaki I, Hiroike T, Toh H, Hayaishi O, Urade Y: Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry*, 38, 8006-8013 (1999)

34. Dieter P, Hempel U, Malessa B, Fitzke E, Tran-Thi TA, MacLouf J, Creminon C, Kanaoka Y, Urade Y: Lipopolysaccharide-and liposome-encapsulated MTP-PE-induced formation of eicosanoids, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 469, 443-448 (1999)
35. Eguchi N, Minami T, Shirafuji N, Kanaoka Y, Tanaka T, Nagata A, Yoshida N, Urade Y, Ito S, Hayaishi O: Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *PNAS*, 96, 726-730 (1999)
36. Inui T, Ohkubo T, Urade Y, Hayaishi O: Enhancement of lipocalin-type prostaglandin D synthase enzyme activity by guanidine hydrochloride. *BBRC.*, 266, 641-646 (1999)
37. Inui T, Ninomiya H, Sasaki Y, Makatani M, Urade Y, Masaki T, Yamamura T: Selective activation of excitation-contraction coupling pathways by ET(A) and ET(B) receptors in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 126, 893-902 (1999)
38. Mase M, Yamada K, Iwata A, Matsumoto T, Seiki K, Oda H, Urade Y: Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci. Lett.*, 270, 188-190(1999)
39. Taniike M, Mohri I, Eguchi N, Irikura D, Urade Y, Okada S, Suzuki K: An apoptotic depletion of oligodendrocytes in the twitcher, a murine model of globoid cell leukodystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58, 644-653 (1999)
40. Urade Y, Eguchi Y, Eguchi N, Kijima Y, Matsuura Y, Oda H, Seiki K, Hayaishi O: Secretion of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) from human heart to plasma during coronary circulation. *Adv Exp Med Biol* 469: 49-54, 1999.
41. Urade Y, Hayaishi O: Prostaglandin D₂ and sleep regulation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1436, 606-615 (1999)
42. Yamamoto S, Ueda N, Mahmud I, Yamaguchi H, Yamashita R, Yamamoto K, Ishimura K, Urade Y, Kanaoka Y, Hayaishi O: Fatty acid cyclooxygenase induction and prostaglandin D synthesis in a human megakaryoblastic cell line CMK differentiated by phorbol ester. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 469, 17-21 (1999)
43. Beuckmann CT, Lazarus M, Gerashchenko DY, Mizoguchi A, Nomura S, Mohri I, Uesugi A, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O, Urade Y: Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta- trace) in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 428, 62-78 (2000)
44. Beuckmann CT, Fujimori K, Urade Y, 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)
45. Fujimori K, Kanaoka Y, Sakaguchi Y, Urade Y: Transcriptional activation of the human hematopoietic prostaglandin D synthase gene in megakaryoblastic cells. Roles of the oct-1 element in the 5'-flanking region and the AP-2 element in the untranslated exon 1. *J. Biol. Chem.*, 275, 40511-40516 (2000)
46. Garcia-Fernandez LF, Iniguez MA, Eguchi N, Fresno M, Urade Y, Munoz A: Dexamethasone induces lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression in mouse neuronal cells. *J. Neurochem.*, 75, 460-470 (2000)
47. Gerashchenko DY, Okano Y, Urade Y, Inoue S, Hayaishi O: Strong rebound of wakefulness follows prostaglandin D₂- or adenosine A_{2a} receptor agonist-induced sleep. *J. Sleep Res.*, 9,

- 81-87(2000)
48. Gerena RL, Eguchi N, Urade Y, Killian GJ: Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis. *J. Androl.*, 21, 848-854 (2000)
 49. Gerena RL, Irikura D, Eguchi N, Urade Y, Killian GJ: Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. *Biol. Reprod.*, 62, 547-556 (2000)
 50. Hiraoka A, Seiki K, Oda H, Eguichi N, Urade Y, Arato T, 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)
 51. Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, Sakaguchi Y, Urade Y, Hayaishi O: Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. Conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.*, 267, 3315-3322 (2000)
 52. Kubata BK, Duszenko M, Kabututu Z, Rawer M, Szallies A, Fujimori K, Inui T, Nozaki T, Yamashita K, Horii T, Urade Y, Hayaishi O: Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J. Exp. Med.*, 192, 1327-1338 (2000)
 53. Kuwamoto K, Miyauchi-Hashimoto H, Tanaka K, Eguchi N, Inui T, Urade Y, Horio T: Possible involvement of enhanced prostaglandin E₂ production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice. *J. Inv.Dermatol.*, 114, 241-246 (2000)
 54. Many H, Sato Y, Eguchi N, Seiki K, Oda H, Nakajima H, Urade Y, 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. (Tokyo)* 127, 1001-1011 (2000)
 55. 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, Narumiya S: Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma. *Science*, 287, 2013-2017 (2000)
 56. Pinzar E, Miyano M, Kanaoka Y, Urade Y, Hayaishi O: Structural basis of hematopoietic prostaglandin D synthase activity elucidated by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 275, 31239-31244 (2000)
 57. Pinzar E, Kanaoka Y, Inui T, Eguchi N, Urade Y, Hayaishi O: Prostaglandin D synthase gene is involved in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *PNAS*, 97, 4903-4907 (2000)
 58. Yamamoto S, Ueda N, Mahmud I, Yamaguchi H, Yamashita R, Yamamoto K, Ishimura K, Urade Y, Kanaoka Y, Hayaishi O: Fatty acid cyclooxygenase induction accompanied by prostaglandin D synthesis in a human megakaryoblastic cell line CMK differentiated by phorbol ester. *Biofactors*, 11, 57-61 (2000)
 59. Hiraoka A, Seiki K, Oda H, Eguchi N, Urade Y, Tominaga I, Baba K: Charge microheterogeneity of the β -trace proteins (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders analyzed by capillary isoelectrofocusing. *Electrophoresis*, 22, 3433-3437 (2001)
 60. Hirawa N, Uehara Y, Ikeda T, Gomi T, Hamano K, Totsuka Y, Yamakado M, Takagi M, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y: Urinary prostaglandin D synthase

- (beta-trace) excretion increases in the early stage of diabetes mellitus. *Nephron*, 87, 321-327 (2001)
61. Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O: Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *PNAS*, 98, 9965-9970 (2001)
 62. Inoue T, Takayanagi K, Morooka S, Uehara Y, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y: Serum prostaglandin D synthase level after coronary angioplasty may predict occurrence of restenosis. *Thromb Haemost*, 85, 165-170 (2001)
 63. Miyauchi-Hashimoto H, Kuwamoto K, Urade Y, Tanaka K, Horio T: Carcinogen-induced inflammation and immunosuppression are enhanced in xeroderma pigmentosum group A model mice associated with hyperproduction of prostaglandin E₂. *J. Immunol.*, 166, 5782-5791 (2001)
 64. Mizoguchi A, Eguchi N, Kimura K, Kiyohara Y, Qu WM, Huang ZL, Mochizuki T, Lazarus M, Kobayashi T, Kaneko T, Narumiya S, Urade Y, Hayaishi O: Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *PNAS*, 98, 11674-11679 (2001)
 65. Scammell TE, Gerashchenko DY, Mochizuki T, McCarthy MT, Estabrooke IV, Sears CA, Saper CB, Urade Y, Hayaishi O: An adenosine A_{2a} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, 107, 653-663 (2001)
 66. Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, Kudo I: Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, 276, 34918-34927 (2001)
 67. Diaz BL, Fujishima H, Kanaoka Y, Urade Y, Arm JP: Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in mouse bone marrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids. *J. Immunol.*, 168, 1397-1404 (2002)
 68. Fujimori K, Okada T, Urade Y: Expression of NADP(+)-Dependent 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase mRNA in Monkey Ocular Tissues and Characterization of Its Recombinant Enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 383-389 (2002)
 69. Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, Uodome N, Okazaki-Hatake K, Urade Y: Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.*, 168, 443-449 (2002)
 70. Hamano K, Totsuka Y, Ajima M, Gomi T, Ikeda T, Hirawa N, Eguhi Y, Yamakado M, Takagi M, Nakajima H, Oda H, Seiki K, Eguchi N, Urade Y, Uehara Y: Blood sugar control reverses the increase in urinary excretion of prostaglandin D synthase in diabetic patients. *Nephron*, 92, 77-85 (2002)
 71. Hirawa N, Uehara Y, Yamakado M, Toya Y, Gomi T, Ikeda T, Eguchi Y, Takagi M, Oda H, Seiki K, Urade Y, Umemura S: Lipocalin-type prostaglandin D synthase in essential hypertension. *Hypertension*, 39, 449-454 (2002)
 72. Kabututu Z., Martin SK, Nozaki T, Kawazu S, Okada T, Munday CJ, Duszenko M, Lazarus M, Thuita LW, Urade Y, Kubata BK: Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H₂ reductase in *Leishmania*. *Intl. J. Parasitol.*, 32, 1693-1700 (2002)
 73. Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzaki S, Ohkubo K, Lazarus M, Maruyama

- T, Martin SK, Duszenko M, Urade Y: A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med., 196, 1241-1251(2002)
74. Lazarus M, Munday CJ, Eguchi N, Matsumoto S, Killian GJ, Kubata BK, Urade Y: Immunohistochemical Localization of Microsomal PGE Synthase-1 and Cyclooxygenases in Male Mouse Reproductive Organs. Endocrinology, 143, 2410-2419 (2002)
75. Lazarus M, Kubata BK, Eguchi N, Fujitani Y, Urade Y, Hayaishi O: Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. Arch. Biochem. Biophys., 397, 336-341 (2002)
76. Negoro H, Soo Shin W, Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-Oka T, Fujita T, Omata M, Uehara Y: Endogenous prostaglandin D₂ synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells. J. Hypertens, 20, 1347-1354 (2002)
77. Oda H, Shiina Y, Seiki K, Sato N, Eguchi N, Urade Y: Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase. Clin. Chem. 48, 1445-1453 (2002)
78. Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J, Urade Y, Taniike M: Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. Acta. Neuropathol. (Berl) 104, 377-384 (2002)
79. Taniike M, Mohri I, Eguchi N, Beuckmann CT, Suzuki K, Urade Y: Perineuronal oligodendrocytes protect against neuronal apoptosis through the production of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a genetic demyelinating model. J. Neurosci., 22, 4885-4896 (2002)

(2) 特許出願 (国内 10 件、海外 4 件)

① 国内

1. 発明者：裏出良博、織田浩司、清木興介、中島浩、佐藤信行、上原譽志夫、上原伸二
 発明の名称：腎疾患の検出および病態管理方法
 出願番号：特願平 10-251450
 出願日：H. 10. 9. 4
 出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ(株) 科学技術振興事業団
 公開番号：特開 2000-146980 公開日：H12. 5. 26
 PCT (US, EP, AU, CND, KR)
 出願番号：JP99-04804 出願年月日：1999. 9. 3
 公開番号：0999447 公開日：2000. 5. 10
2. 発明者：裏出良博、清木興介、織田浩司、中島浩、佐藤信行
 発明の名称：冠血管インターベンション施行後の再狭窄の予測方法
 出願番号：特願平 11-512160
 出願日：H. 11. 2. 26
 出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ(株) 科学技術振興事業団
 PCT (US, EP, AU, CND, KR)

- 出願番号：JP00-01109 出願日：2000. 2. 25
3. 発明者：裏出良博、藤谷靖志、北山博章、林直木
発明の名称：ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法
出願番号：特願平 11-284610
出願日：H. 11. 10. 5
出願番号：特願 2000-166726 最出願日：H12. 6. 2
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 オリエンタル酵母工業株式会社
科学技術振興事業団
PCT (US, EP, CND, 日本)
出願番号：JP00-06963 出願年月日：H12. 10. 5
4. 発明者：裏出良博、江口直美、北山博章、林直木
発明の名称：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動物と
これを用いた試験方法
出願番号：特願平 11-285997
出願日：H. 11. 10. 6
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 オリエンタル酵母工業株式会社
科学技術振興事業団
公開番号：特開 2001-103869 公開日：H13. 4. 17
5. 発明者：裏出良博、江口直美、乾隆、中右博也、間瀬光人、清木興介、織田浩司、中
島浩、佐藤信行
発明の名称：頭蓋内出血後の予後改善薬
出願番号：特願 2000-27778
公開番号：特開 2001-220354 公開日：H13. 8. 14
出願日：H. 12. 2. 4
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ株式会社 科学技術振興事業団
6. 発明者：裏出良博、徳川吉弘、清木興介、織田浩司、中島浩、佐藤信行
発明の名称：破水の検出方法
出願番号：特願 2000-22983
出願日：H. 12. 1. 31
公開番号：特開 2001-215226 公開日：H13. 8. 10
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ株式会社
7. 発明者：裏出良博、江口直美、乾隆、中右博也、間瀬光人、佐藤信行、中島浩、織田
浩司、清木興介
発明の名称：痴呆性疾患鑑別方法
出願番号：2000-221248
出願日：H. 12. 7. 21

出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ株式会社
科学技術振興事業団

PCT (US, EP, CND, 日本)

出願番号：JP01-04811 出願年月日：2001. 6. 7

公開番号：WO02-08756 公開日：2002. 1. 31

8. 発明者：裏出良博、早石修、入倉大祐、井上豪、甲斐泰、岡野洋介、松村浩由、衣笠茂浩、山本雅貴、熊坂崇、宮野雅司

発明の名称：プロスタグランジン D 合成酵素の 3 次元立体構造及びその使用

出願番号：2001-346035

出願日：H.13.11.12

出願人：大阪バイオサイエンス研究所 科学技術振興事業団 理化学研究所

9. 発明者：井上豪、板井昭子、武藤進、裏出良博、甲斐泰

発明の名称：ヒト由来プロスタグランジン合成酵素阻害剤

出願番号：特願 2002-084603

出願日：H. 14. 3. 25

出願人：科学技術振興事業団

10. 発明者：裏出良博、江口直美、有竹浩介、佐藤陽、角山圭一、谷池雅子

発明の名称：脳損傷の予後改善薬とそのスクリーニング法

出願番号：特願 2002-204725

出願日：H. 14. 7. 12

出願人：大阪バイオサイエンス研究所 科学技術振興事業団

② 海外

1. 発明者：裏出良博、織田浩司、清木興介、中島浩、佐藤信行、上原譽志夫、上原伸二
発明の名称：腎疾患の検出および病態管理方法

PCT (US, EP, AU, CND, KR)

出願番号：JP99-04804 出願年月日：1999. 9. 3

公開番号：0999447 公開日：2000. 5. 10

出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ(株) 科学技術振興事業団

2. 発明者：裏出良博、清木興介、織田浩司、中島浩、佐藤信行

発明の名称：冠血管インターベンション施行後の再狭窄の予測方法

出願番号：特願平 11-512160

PCT (US, EP, AU, CND, KR)

出願番号：JP00-01109 出願日：2000. 2. 25

出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ(株) 科学技術振興事業団

3. 発明者：裏出良博、藤谷靖志、北山博章、林直木
発明の名称：ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法
PCT (US, EP, CND, 日本)
出願番号：JP00-06963 出願年月日：H12. 10. 5
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 オリエンタル酵母工業株式会社
科学技術振興事業団
4. 発明者：裏出良博、江口直美、乾隆、中右博也、間瀬光人、佐藤信行、中島浩、織田
浩司、清木興介
発明の名称：痴呆性疾患鑑別方法
PCT (US, EP, CND, 日本)
出願番号：JP01-04811 出願年月日：2001. 6. 7
公開番号：WO02-08756 公開日：2002. 1. 31
出願人：大阪バイオサイエンス研究所 マルハ株式会社
科学技術振興事業団

(3) 新聞報道等

新聞報道

1. 日経サイエンス 1999 8月号
脳の見方、物の見方 「人はなぜ眠るのか物質から探る」
2. 産経新聞 朝刊 平成 14 年 1 月 14 日
第 4 部「脳を探る」⑩ 「睡眠ホルモン」
3. 日経バイオテク 平成 14 年 4 月 8 日版
「阪大、大阪バイオ研：PGD₂ 合成酵素と阻害剤の結晶構造解析」
4. 毎日新聞 夕刊 平成 14 年 9 月 24 日
「理系白書 失敗とセレンディピティ」