

In vitro および in vivo におけるプロスタグランジン D 合成酵素の セレンウムによる阻害について

早 石 修

(大阪バイオサイエンス研究所)

Inhibition of prostaglandin D synthase by inorganic quadrivalent selenium compounds in vitro and in vivo

Osamu Hayaishi

Osaka Bioscience institute

During the last 10 years, we showed that prostaglandins (PG) D₂ and E₂ are the major sleep regulating substances in the brain, each promoting sleep and wakefulness. Recently we discovered that various inorganic quadrivalent selenium compounds are potent, specific and non-competitive inhibitors of brain prostaglandin D synthase. K_i is about 10⁻⁶ M. Hexavalent compounds and organic selenium compounds are not inhibitory. Other enzymes in the arachidonate cascade system are not inhibited. This inhibition is reversible and can be reversed by sulfhydryl compounds such as glutathione or DTT. When one of these inorganic quadrivalent selenium compounds was infused into the third ventricle of a freely moving rat, sleep was inhibited time- and dose-dependently and reversibly, indicating that PGD synthase is the key enzyme in sleep regulation and that PGD₂ is the endogenous sleep-regulating substance in the rat under physiological conditions.

Because the sleep pattern of rats is somewhat different from that of primates, we further extended these studies to the *Macaca mulatta*, that is, the Rhesus monkey. More recently, we found that intraventricular infusion of prostaglandin E₂ reduces the amount of diurnal sleep of rats, or increases the amount of wakefulness.

私どもは毎日毎晩、睡眠と覚醒のリズムを繰り返し、人生のほぼ3分の1を眠ってすごしております。現在30歳の方は10年間、60歳の方は実に20年の歳月を眠っておられるわけです。このように眠りと目覚めという現象は私どもが日常経験している最も身近な、またきわめて重要な脳の、あるいは全身の生理現象ですが、不思議なことに現代の医学では睡眠についてほとんど研究されておらず、その生化学的な調節機構についても従来ほとんど知られておりません。

例えば、人間は本来、赤ん坊のように眠っているのが自然の状態、脳内で覚醒ホルモンが作用する

と起きて働くのでしょうか。あるいは、本来、目覚めているのが自然の状態、睡眠ホルモンのようなものが作用すると眠るのでしょうか。このようなきわめて単純で基本的な質問にさえ、現在の医学の教科書では答をみることができません。

このように睡眠と覚醒の調節機構は、基礎医学や生化学の問題としてもきわめて興味がある重大な問題ですが、また一方では医療問題、社会問題としても近年、大変注目されるようになってきました。すなわち、最近ストレス社会、高齢化社会になり、不眠症、時差ボケなど睡眠障害がふえてきており、その一部は精神神経疾患の初期症状とも関連が深いことはご承知のとおりです。これらの睡眠障害の治療に用いられる睡眠剤や覚醒剤についても副作用やその他の点でいろいろな問題があります。特に、従来比較的無害といわれていたベンゾジアゼピン系の睡眠剤について、最近、健忘、情緒不安定などの諸症状を引き起こすことが知られてきており、ヨーロッパの2、3の国では発売を停止したり、わが国でもマスコミが大きくとりあげています。さらに、従来、薬剤の副作用としてはあまり注目されていなかった睡眠障害が最近では臨床的に重要視され、特に長期間投与される薬剤、例えばコレステロール下降剤、免疫抑制剤などで問題になっていることもご承知の通りです。

本日は、私どもの研究室で過去10年にわたって研究してまいりました成果をとりまとめて、とくに *in vitro* と *in vivo* におけるセレンウムによるプロスタグランジン D 合成酵素の阻害を中心にお話申し上げます。

プロスタグランジンとは？

プロスタグランジン（以下 PG と略す）は1930年にニューヨークの婦人科医 Kurzrok によって、人口受精を行っているときに偶然、精液のなかから発見された一種の臓器ホルモン、局所ホルモンです。その後、von Euler がこの物質が従来の生理活性物質、すなわちアミンやペプチドと異なり油の一種で酸性の物質であることを証明し、prostate gland、前立腺でつくられる物質であろうと考え“プロスタグランジン”と命名したわけです。その構造は1960年代になって Bergstrom らによって明らかにされました。それ以後、約30年の間に PG 類はほとんどすべての細胞に存在し、きわめて多彩な活発な生理活性を示していることが証明され、医学的にも薬学的にも非常に広くまた深く研究されてきました。

さて、天然にある PG 類はビタミンと同じように A, B, C, D……など約30種類に分類されます。PG は全身のほとんどすべての臓器に分布し、循環器、呼吸器、消化器、泌尿生殖器などで数々の重要な生理活性を示す物質であり、したがって炎症、脳卒中、狭心症、その他いろいろな病気にも深くかかわっています。しかし、今から約10年ほど前までは、中枢神経系における PG の存在、代謝、機能についてはほとんど知られるところがありませんでした。

そこで、私どもはまず脳内の PG の存在を調べてみたところ、ラットその他の動物の脳で PGD₂ が主たる PG の一つであることが明らかになりました。従来、この PGD₂ は一般の臓器では存在量も少なく、生理活性に乏しい PG といわれており、一般の PG 研究者に無視されていたため、私どもはひょっとすると PGD₂ が脳に固有の PG であり、何か重要な、脳に特有なユニークな働きをしているのではないかと考えたのです。そこで、PGD₂ の働きを調べるために、私どもは PG は細胞膜の外にある受容体と結

合して作用するのであろうと考え、このPGD₂の受容体の脳内分布をオートラジオグラフィー法によって調べてみました。その結果、受容体の分布のもっとも多い部分は灰白質、すなわち神経細胞の多い部分にかぎられており、しかも脳内全般に分布せず特定の部分に存在することから、PGD₂が脳内で特定の機能に関係していることが推定されました。特に、そのなかでも視束前野に受容体が多く集まっていることに注目しました。

以前から視束前野（又は視索前野ともいわれますが）は、睡眠中枢、温度調節中枢であるということが神経解剖学者や神経生理学者によって提唱されておりましたが、その生化学的なメカニズムについてはまったく不明でした。私どもは、1982年当時、大阪大学の故中山教授、石川助教授らと共同して、視束前野にナノモル程度、すなわち約10億分の1モル程度のPGD₂をマイクロインジェクション法で注入したところ、体温の下降と同時に睡眠量が5、6倍に増加し、覚醒時間が約半分に減少することを明らかにしました。この効果は視束前野に特異的であり、脳の他の部分すなわち後部視床下部、タラムス・青班核、大脳皮質等では無効でした。また、PGD₂に特異的で他のPGは無効でした。そこで、私どもは、従来まったく不明であった睡眠の生化学的な調節機構に初めて手がかりをえることができたと考え、思いきって睡眠の研究に入ったのです。

2 種類の睡眠

さて、睡眠、覚醒という現象はきわめて複雑な現象であり不明な点が多いのですが、ごく簡単に説明すると、覚醒、徐波睡眠（Slow Wave Sleep）、レム睡眠（Rapid Eye Movement Sleep）の3種類に大別できます。この3者は動物の挙動からも推測はできますが、定量的な実験をするためには脳波、眼電図、筋電図、その他いろいろなパラメータを数日にわたり記録し、分析することが必要です（図1）。例えば、徐波睡眠では名のごとく、ゆっくりした振幅の大きな脳波がみられます。レム睡眠では脳波は覚醒

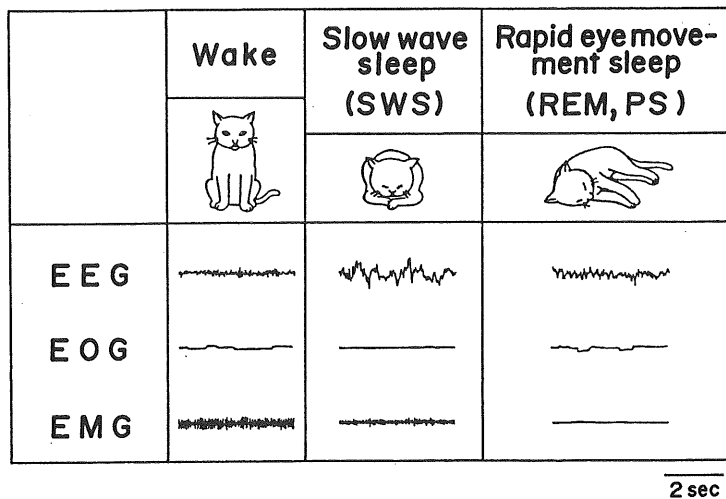


図1

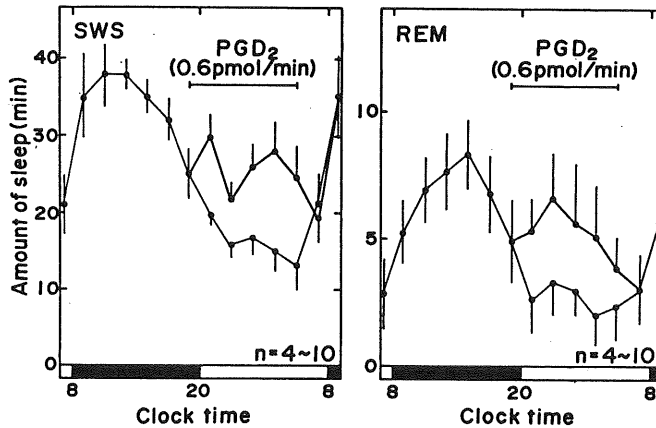
Effect of PGD₂ on Sleep Patterns

図 2

時と似ており、また Rapid Eye Movement Sleep の名の通り、眼球が急速に動きますが、筋肉の緊張はまったく消失しており、脳は活動して夢をみているが、筋肉はまったく動かない金縛りの状態を呈することもあります。すなわち、学者によると徐波睡眠は脳の眠りで、レム睡眠は身体の眠りだという人もいます。

このように睡眠と覚醒の状態の質と量を秒単位で長時間調べることはたいへん厄介で手数がかかり、酵素の活性測定のように簡単ではありません。私どもは東京医科歯科大学の井上教授、本田博士の開発された方法を改良して、睡眠を定量的に測定しました。すなわち、あらかじめ脳波電極などを組み込んだネズミに細いカニューレを使い、第3脳室内にきわめて微量の試料を10 μ l/h というような非常にゆっくりした速度で連続注入すると同時に、脳波、筋電図、行動をモニターし、ポリグラフで記録したデータをコンピューターで計算する一方、ビデオで動物の挙動を記録するようにしました。このような条件下で PGD₂ の効果を調べた典型的なデータが図 2 です。

PGD₂ の睡眠誘導効果

この図 2 は、縦軸に睡眠量、横軸に時間をプロットしたのですが、ご承知のように、ネズミは夜行性の動物で人間と違って昼の間寝ていることが多く、夜になると起きて活動しています。夜、起きているときに PGD₂ を 0.6 picomol/min というきわめて微量を第 3 脳室に連続注入すると、図のように徐波睡眠、レム睡眠ともに増加します。PGD₂ の効果は用量依存性であり、1 femtomol/sec (1000 兆分の 1 モル) という超微量で効力があります。また、PGD₂ に特異的で PGD₃ を除く他の PG はほとんど、あるいはまったく睡眠活性がありません¹⁾。

もっともたいせつなことは、PGD₂ によってえられる睡眠は脳波、その他の所見から生理的な睡眠とまったく区別されないことです。従来から睡眠あるいは覚醒を起こすいろいろな天然物や合成薬品が報告されていますが、生理的な睡眠を引き起こす物質はほとんどありませんが、PGD₂ による睡眠は自然

Circadian Changes of PGD Synthase and PGD₂ Dehydrogenase in Rat Brain

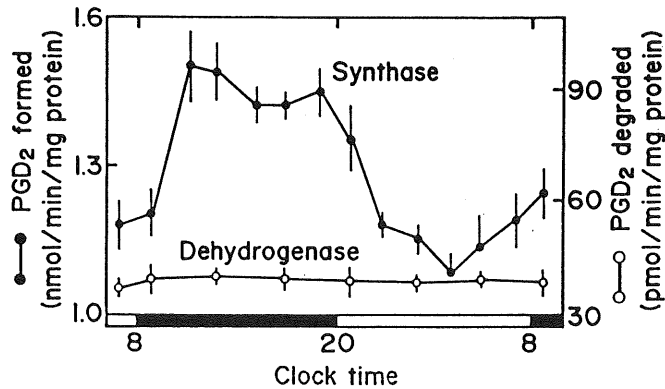


図3

の睡眠とまったく区別できません。

さらに、PGD₂の作用が単に薬理的なものではなく、本当に生理的な条件下で毎日の睡眠を調節している脳内物質であるかどうかを実験的に確かめるために、私どもはPGD₂の合成酵素の活性を24時間にわたって調べてみました(図3)。ラット脳内におけるPGD合成酵素の比活性はラットが眠っている昼間に活性が高く、夜に低下します。脳内の他の酵素、例えばPGD分解酵素の活性は合成酵素に比べるとほとんど日内変動を示しません。このデータはラットが昼間寝ている間に脳内でPGD₂がより多量につくられ、夜起きているときは少ないことを示しており、PGD₂が生理的睡眠にかかわっているという考えとよく一致します。

もし、私どもの解釈が正しいとすれば、ラットが主として眠っている昼間、PGD₂の合成阻害剤をつかって、PGD₂の合成酵素を阻害すればラットは睡眠量が減少するはずですが。しかし、当時はこの酵素については詳しい研究がなく、よい阻害剤がありませんでした。そのため、私どもはラットとヒトの脳からPGD合成酵素を精製し、その性質を詳しく調べたところ、特異的な阻害剤を発見することに成功しました。

PGD 合成酵素

PGD合成酵素は、脳内でPGH₂からPGD₂への異性化反応を触媒します(図4)。精製されたPGD合成酵素は、分子量約2万5000のモノマーの糖タンパク質です。私どもはヒトの脳、ラットの脳からこの酵素を精製し、cDNAをとりだし、アミノ酸配列と塩基配列を決定しました。ヒトの脳の本酵素のisozyme二つのラットの酵素のcDNAをとりだし、ヌクレオチドとアミノ酸の配列を調べたところ、この3者にはたいへん高いホモロジーがみられます。そこで、コンピューターでタンパク質の一次構造データベースを検索したところ、意外なことにPGD合成酵素はリポカリンと呼ばれる一群の脂肪や油と結合して運搬するタンパク質のファミリーと相同性が高いことが明らかになりました。

リポカリンファミリーに属する主要タンパク質は、アミノ酸残基160-190 からなる小型の分泌型タンパク質で、低分子の脂質と結合し、運搬する生理的に重要な働きをしています。これらのタンパク質は自然界に広く分布し、哺乳類、鳥類、両生類、甲殻類、昆虫等に見出されていますが、従来知られているのはすべて結合タンパク質で酵素活性を持っておらず、PGD 合成酵素は唯一の例外です。

一般にタンパク質の進化の過程では、三次構造のほうが一次構造よりよく保存されているという原則があります。この場合にも全体として一次構造の相同性は15~25%と必ずしも高くありませんが、三次構造はきわめてよく保存されているので、すでに結晶化されX線解析によって三次構造の判明しているβ-ラクトグロブリン、アポリポタンパクD、レチノール結合タンパクの三次構造を基にしてPGD 合成酵素の構造をコンピューターグラフィックで推定したところ、図5のようになりました。

Prostaglandin D Synthase

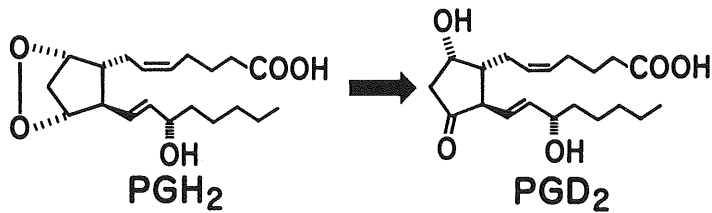


図4

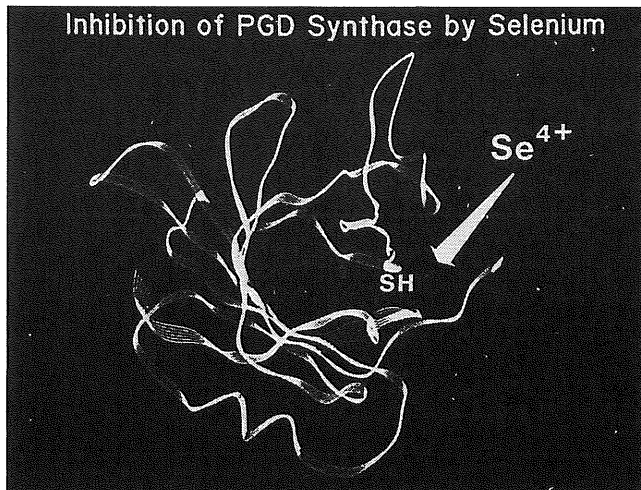


図5

リポカリンは一般に β バレル構造をとっている疎水性のポケットに油が結合するわけですが、その中央部に位置する56番目のシステインはPGD合成酵素のみに存在し、基質PGH₂のendoperoxideの部分の結合に関係していると推測されます。私どもは4価のセレンウム化合物が本酵素の特異的で強力な阻害剤であることを発見しましたが、Se⁴⁺は多分、この-SH基に結合して酵素作用を阻害するものと推測されています。

PGD合成酵素の阻害実験

図6のデータは、精製された純粋な酵素を用いた *in vitro* の実験結果です。4価の無機セレンウム化合物、例えば塩化セレンウムやナトリウム・セテナイトなどは *in vitro* でこのように用量依存的にPGD合成酵素を阻害しますが、その阻害作用はSH剤で打ち消されます。また、6価の化合物や有機化合物はほとんど阻害効果がありません。さらに、セレンウムの阻害はプロスタグランジン代謝経路の他の酵素には阻害効果を示しません。したがって、PGD合成酵素に特異的な阻害剤であることが明らかになりました²⁾。

そこで、セレンウムクロライドを先ほどの睡眠検索システムを用いてラットの脳内に連続注入したところ、注入してまもなくから徐波睡眠、レム睡眠とも睡眠量が減少し、2時間程度で動物はまったく眠らない状態になります。しかし、注入を中断すると眠りだし、再注入するとふたたび睡眠障害が起こります(図7)。また、*in vitro* の実際同様、SH剤でその作用は打ち消されます³⁾。

以上の実験から、私どもはPGD₂がただ単に睡眠剤のように動物を眠らせるだけではなく、自然の睡眠を調節している内在性の生理的な睡眠調節物質であること、また、脳内のPGD₂合成酵素が睡眠を司る酵素であると結論するにいたりました。

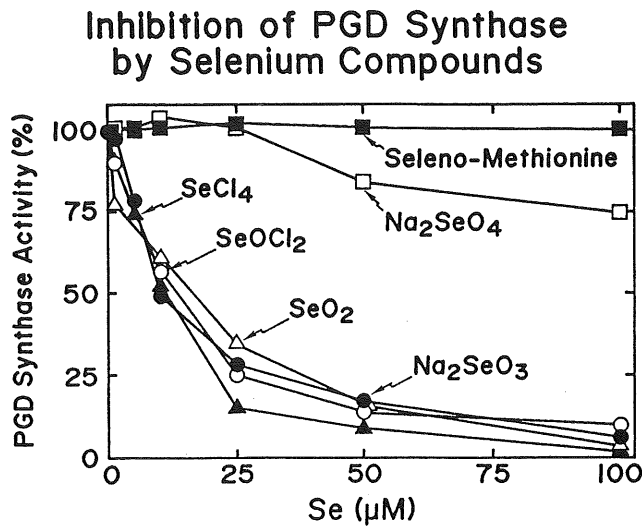


図6

Effect of SeCl₄ on Sleep

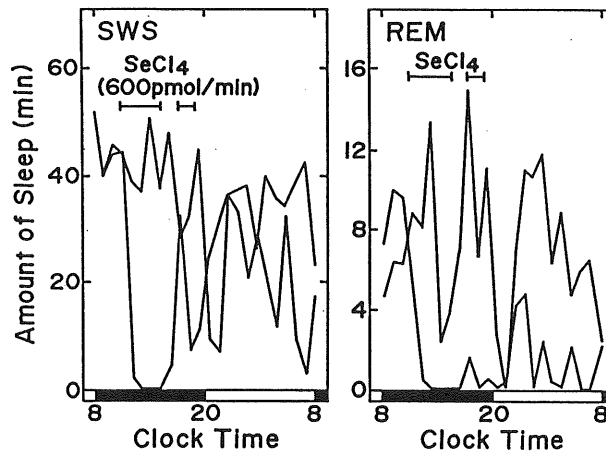


図7

しかしながら、以上の実験はラットで行われ、それ以外の動物、特にヒトではどうかという疑問があります。そこで、私どもはさらに赤毛ザルを用いて、同様の実験を行ってみました。

サルでの実験

この実験は最初は、当時、岡崎におられた大村裕教授のグループと共同して行ったものです。基本的にはネズミの場合と同様ですが、サルの場合、眼電図をとることと、周波数分析を行うなど、より詳細な検討を行いました。簡単に述べると、覚醒状態のサルでは典型的な脳波や眼電図、筋電図がみられますが、微量の PGD₂ を第三脳質に注入すると、たちどころに徐波睡眠がみられ、脳波は徐波化し、しばらくするとヒトの睡眠と同様にレム睡眠に移行します。すると脳波はもとへ戻り、眼は動き、筋肉の動きはなくなります。

さらに、私どもは周波数分析を行い、特定の時間での脳波の波長の分析を調べてみました。サルの昼寝の状態、夜間の睡眠の状態、また昼間 PGD₂ で眠らせている脳波の周波数分析の波形はほとんど変化がありませんが、最近よく使われてきているベンゾジアゼピン系睡眠剤を使うと、3 Hz 前後にある δ 波が非常にシャープになり、正常の睡眠で見られる 5 Hz 前後の θ 波はほとんど消失し、かわりに 20 Hz 前後のベンゾジアゼピン速波というピークがみられるようになります。このような実験から、現在市販されているもっとも新しい進歩した睡眠薬を使っても、本当の睡眠とは質的に異なっていること、それに対して PGD₂ による睡眠は霊長類でもまったく自然の睡眠と区別できないことが実証されました⁴⁾。

以上で PGD₂ が眠りを調節しているという最初の話題を終わり、次に第 2 の話題 PGE₂ の話に移ります。

PGE₂と覚醒

さて、PGE₂はPGD₂の異性体であり、9位と11位のケトンと水酸基が逆になっている positional isomer ですが、従来からPGD₂と全く反対の生理活性を示す場合がいくつか知られています。例えば、PGE₂は体温を上昇させ、LHRH というホルモンの分泌を促進し、大腸粘膜のイオン輸送を促進しますが、PGD₂は逆にこれらのすべての現象を阻害または減少させることが報告されています。

そこで、私どもは先ほどと同じ条件でPGE₂を昼間にラットの第三脳室に注入してみました。ラットが主に寝ている昼間10picomol/min 程度のPGE₂を連続注入すると、図8のように徐波睡眠、レム睡眠ともに用量依存性に減少すること、すなわち覚醒量がふえることが証明された⁵⁾。

このPGE₂の覚醒効果が生理的なものであることを証明するため、私どもはPGE₂のアンタゴニストを脳内に投与してみました。Glaxo の製品であるAH6809は、筋肉や痛覚(痛み)の実験で、PGE₂受容体の中でEPI というタイプのアンタゴニストとしてすでに証明されている物質です。AH6809はPGE₂と同時に投与するとPGE₂の覚醒作用を打ち消しますが、もし内在性のPGE₂が脳内で覚醒作用を生理的に示しているとすれば、アンタゴニストの単独投与によって、内在性PGE₂の作用が打ち消され、睡眠量が増加するはずですが、事実、きわめて微量のAH6809を夜間、第三脳室に注入すると、睡眠量は用量依存的に増加します⁶⁾。

以上の実験結果は、二つの重要な結論を導くこととなります。すなわち、PGE₂がラットの生理的な覚醒の調節にかかわっている内在性の一種のホルモンあるいは情報伝達物質であるということが結論されます。また、PGE₂のアンタゴニストは、新しいタイプの睡眠剤として開発される可能性が示されたわけです。

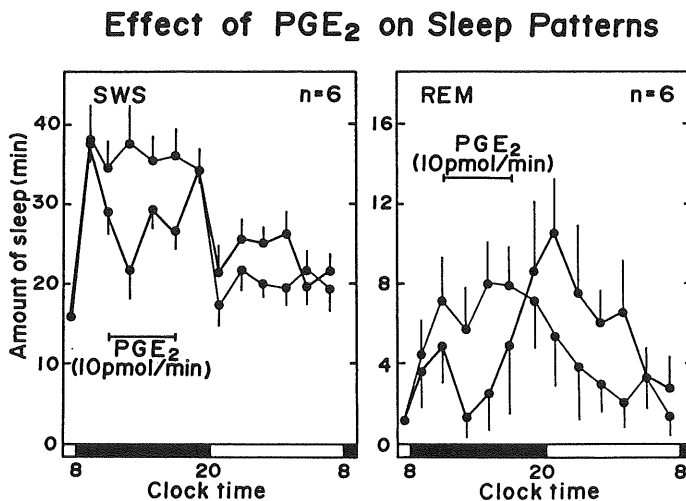


図8

睡眠障害と PG

さて、私どもがよく経験する不眠症、ナルコレプシー（これは居眠り病ともいわれ食事中や歩いているときに突然眠りだすという厄介な病気です。日本やアメリカでは一般人口の0.1%つまり1000人に1人程度の患者がいるといわれています）、時差ボケ、睡眠時無呼吸症（これは40歳から70歳までの成人男子では発生頻度が数10%をいわれ、子供では小児突然死症候群の原因の一つです）、睡眠病などいろいろな睡眠障害はPGの代謝以上によって引き起こされる代謝病なのでしょうか。また、以上の知見を睡眠障害の治療や予防に使うことは可能でしょうか。

例えば、睡眠病は、アフリカのウガンダ地方を中心とする感染症の眠り病であることで知られています。最近、イギリスのサルフォード大学のペントリース博士は24名の重症、12名の軽症の睡眠病患者の脊髄液中のインターローキン I α と PGD₂, E₂ を測定し、PGD₂だけがその重症度にしたがって特異的に増加していることを発見し、おそらく睡眠病のねむりの原因がPGD₂によるものであろうと結論しております⁷⁾。また、アメリカのオーツ博士達は、mastocytoma という病気の患者が深い昏睡状態に陥るとき、血液中に大量のPGD₂が放出されることを報告しています⁸⁾。これらの報告はPGD₂がヒトでも睡眠を起こすこと、特に病的な睡眠にかかわっていることを示しています。

私どもは、数年来、スタンフォード大学の Dement 教授と共同して、同博士の保存しているナルコレプシー犬を用い、PGE₂がその治療に有効であることを証明しました。ナルコレプシー犬は autosomal recessive な遺伝性の疾患で、突然キャタプレクシーという脱力症状を起こし、レム睡眠状態になる病気です。このようなキャタプレクシーの発作は興奮、例えば食欲や性欲などによって引き起こされます。Dement 教授の持っておられるナルコレプシー犬は一見普通のイヌのようですが、好物の餌をみせたり、異性をつれてくると興奮して、たちどころにレム睡眠状態にはいり、筋肉は緊張状態を失ってぐったりと脱力状態に陥ります。

このナルコレプシーを定量的に調べるために、Dement 教授は Food elicited Cataplexy Test (FECT) という検査法を開発されましたが、この方法ではイヌの好物の饅頭を12個部屋の中に楕円形において、そこへナルコレプシー犬をつれていくとイヌは喜んで餌を食べようとし、興奮し、尻餅をつき、すぐに四つん這いになり、数秒レム状態に入ります。しばらくすると、起き上がって次の饅頭を食べるわけですが、12個の饅頭を食べ終わるのに何秒かかるか、またその間に何度キャタプレクシーの発作を起こすかを推定するのです。すなわち、コントロールの実験で食塩水を注射してから1時間、2時間、3時間というように時間を追って実験を繰り返すと、あるイヌでは12個の饅頭を食べるのに約45秒かかり、その間にほぼ5回足らずの発作を起こすことがわかります。そこで、私どもはPGE₂または脳内に入りやすいメチルエステルを0タイムで静脈注射したところ、発作の回数も所要時間も用量依存性に減少することが明らかになりました。すなわち、PGE₂は原理的にはナルコレプシーの治療や予防に有用である可能性を示しています⁹⁾。

結 び

以上の実験から、私どもは睡眠と覚醒がそれぞれ PGD₂ および PGE₂ によって、ラットやイヌやサルやおそらく人間の脳内の調節物質として働いており、それぞれの PG が視束前野と後部視床下部の近くに存在する睡眠と覚醒の中枢において作用しているものであろうと結論しました。これは、従来、深い謎に包まれていた睡眠覚醒を調節する生化学的機構の研究に、ささやかではありますが新しい突破口をもたらしたものと考えられます。

申すまでもなく、睡眠はきわめて複雑な現象でありますので、これだけで問題が解決したとは考えておりません。睡眠覚醒のリズムにしたがって、それぞれの PG の合成がいかにか調節されているのか、また PGD₂ や PGE₂ がどのように働いて、睡眠や覚醒の状態が引き起こされているのかということは、たくさん歯車、すなわち神経や神経伝達が働いており、今後さらに実験を進めたいと考えている次第です。

本研究は新技術事業団、大阪バイオサイエンス研究所の睡眠グループの他に、大阪大学の故中山昭雄先生、東京医科歯科大学の井上昌次郎先生、岡崎国立共同研究機構生理学研究所の大村裕先生、スタンフォード大学の Dement 先生、その他共同研究者の協力によるものです。

文 献

- 1) Ueno, R., Honda, K., Inoue, S., and Hayaishi, O. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 1735-1737
- 2) Islam, F., Watanabe, Y., Morii, H., and Hayaishi, O. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 289 : 161-166
- 3) Matsumura, H., Takahata, R., and Hayaishi, O. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 9046-9050
- 4) Onoe, H., Ueno, R., Fujita, I., Nishino, H., Oomura, Y., and Hayaishi, O. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 4082-4086
- 5) Matsumura, H., Honda, K., Goh, Y., Ueno, R., Sakai, T., Inoue, S., and Hayaishi, O. (1989) Brain Res. 481 : 242-249
- 6) Matsumura, H., Honda, K., Choi, W. S., Inoue, S., Sakai, T., and Hayaishi, O. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5666-5669
- 7) Pentreath, V. W., Rees, K., Owolabi, O. A., Philip, K. A., and Doua, F. (1990) Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 84 : 795-799
- 8) Roberts, J. L., II, Sweetman, B. J., Lewis, R. A., Austen, K. F. and Oates, J. A. (1980) New Engl. J. Med. 303 : 1400
- 9) Nishino, S., Mignot, E., Fruhstorfer, B., Dement, W. C. and Hayaishi, O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2483-2487