論文特集「生物活性物質」

(日本化学会誌, 1981, (5), p. 755~761)

© 1981 The Chemical Society of Japan

海洋動物細胞を指標細胞とした生体高分子合成阻害剤の検索法

——ペントピラニンCのタンパク質合成阻害作用——

(1980年11月4日受理)

池上 晋*・瀬戸治男**・加納和孝***・長野 弘***・真野嘉長***

従来、RNA合成の阻害剤と考えられていたペントピラニンCをウニの受精卵に与えたところ、5 mmol/l以上の濃度で第1卵割を阻止した。また、ヒトデの未成熟卵に卵成熟誘起物質、1-メチルアデニン 1 μ mol/lとともに投与すると、5 mmol/l以上の濃度で卵の成熟の減数分裂過程が阻害された。ウニの初期胚およびヒトデ卵の成熟過程ではRNA合成はほとんど行なわれないので、ペントピラニンCの細胞分裂阻害作用は核酸合成阻害に帰することはできない。

ウニ卵割およびヒトデ卵成熟はいずれもタンパク質の新生に依存しているので、ウニ胚におけるペントピラニンCのタンパク質合成阻害活性を調べたところ、細胞分裂を阻害する濃度で合成の阻害が認められた。

これらの知見から、ヒトデ卵とウニ胚を用いることによって、核酸合成阻害剤やタンパク質合成阻害剤を容易に分別しうることが明らかとなった。

1 緒 言

生物活性物質の開発には、的確な生物活性評価系を樹立することがもっとも重要である。生物活性の評価が個体レベルあるいは器官レベルでなされようと、生体が細胞から構成されているかぎり生物活性の発現は細胞形態の変化としてとらえ得るものである。生物活性物質は細胞を構成する生分子のいくつかを標的分子とするもので、細胞の化学反応系に影響を与える化学物質と定義づけることもできよう。基本的な細胞機能、たとえば細胞分裂や細胞分化の素過程を解析するために、細胞学者は好んで棘皮動物の卵や胚を用いてきた。棘皮動物ウニ、ヒトデは多量に卵を得ることができ、容易に細胞分裂を誘導することが可能であり、また同調的な細胞分化を観察することができる。

こうした利点から、ウニやヒトデでは細胞分裂と細胞分化を支える基本的な生化学反応系がさまざまな角度から調べられ、得られた成果のいくつかは細胞学の大きな資産となっている。こうした研究には、しばしば選択的な生体反応阻害剤が活用され有益な情報がもたらされてきた。しかし多くの場合、すでに他の生体系で評価をうけた薬剤がウニ胚やヒトデ卵に与えられて細胞機能の生化学的過程が解析されたもので、ウニやヒトデが生物活性の評価系として生物活性物質の検索に用いられた例は皆無に等しい。

著者らは、ウニ胚やヒトデ卵の機能に関する豊富な細胞生理化学の情報をもとにして、DNA合成阻害剤や微小管形成阻害剤の

検索法を編み出し、その有効性を報告してきた¹⁾²⁾。その概要はつぎのとおりである(図1)。

ヒトデの十分に発達した卵巣中の卵を顕微鏡で観察すると、大きな核(これを卵核胞と呼ぶ)が見られる(図1-a)。この卵は未成熟で、これに精子を与えても何の変化もみられない。未成熟卵に卵胞が分泌するホルモン、1-メチルアデニンを与えると、卵核胞は消え(図1-b)、第1極体が放出され(図1-c)、つづいて第2極体と雌性前核が形成されて成熟卵となる(図1-d)。卵核胞をもつ未成熟卵(図1-a)が成熟卵(図1-d)になる過程で卵内の染色体のDNA量は1/4に減ずる(3/4は2個の極体に移される)。卵成熟過程でDNA合成が行なわれず、またRNA合成もきわめて低い。したがって、DNA合成阻害剤やRNA合成阻害剤を与えても卵の成熟過程は阻害されない。他方、タンパク質合成はこの過程に不可欠であり、タンパク質合成阻害剤中で卵は卵核胞期(図1-a)にとどまる。

同じ棘皮動物に属するウニの卵は十分に発達した卵巣内ですでに成熟を終えている。この卵に精子を与える(図1-e)と、ただちに受精膜が形成され(図1-f)、1~2時間のうちに第1回の卵割が起こる(図1-g)。受精(図1-e)から第1卵割(図1-g)の間に必ず1回染色体DNAの複製が行なわれる。DNA合成の阻害剤を与えると第1卵割は阻止される。しかし、受精卵のRNA合成能は低い。受精後、タンパク質合成はさかんに行なわれる

1) S. Ikegami, K. Kawada, Y. Kimura, A. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 161(1979).

2) 池上 晋, 磯貝 彰, 鈴木昭憲, 雨宮昭南, 長野 弘, 真野嘉長, 酒井彦一, 日本農芸化学会昭和55年度大会講演要旨集, p. 448(1980).

広島大学生物生産学部応用生化学講座, 720 福山市緑町
** 東京大学応用微生物研究所第6研究部, 113 東京都文京区
弥生

*** 東京大学医学部栄養学教室, 113 東京都文京区本郷

Fig. 1 Schematic representation of stages of starfish oocyte maturation (A) and of embryonic development of sea urchins (B)

- (a): An oocyte at the germinal vesicle stage that is surrounded by follicle cells
 (b): A maturing oocyte whose germinal vesicle is broken down
 (c): A mature oocytes at the first polar body stage
 (d): A mature oocyte with a pronucleus and two polar bodies
 (e): A fertilizing egg
 (f): A fertilized egg that is surrounded by fertilization membrane
 (g): An embryo at the two-cell stage
 (h): A gastrula

Mark (X) indicates the process blocked by cell dis-solvents (I), inhibitors of protein synthesis (II), microtubule inhibitors (III), inhibitors of DNA synthesis (IV) or inhibitors of RNA synthesis (V).

が、このタンパク質合成はメッセンジャー RNA の新生に依存しない、もともと卵の細胞質に貯えられていたメッセンジャー RNA の活性化によっている。それゆえ、第1卵割はタンパク質合成阻害剤で阻止されるが、RNA 合成阻害剤によって影響を受けない。

ヒトデ卵の成熟過程にみられる極体形成でもウニの第1卵割でも、細胞が分裂する直前に紡錘体が形成される。これが染色体を二つの細胞に等分にわけ与える働きを担う。紡錘体は微小管と呼ばれるタンパク質重合体から形成されている。したがって微小管形成阻害剤はヒトデの卵成熟もウニの卵割も阻害するが、この阻害剤の存在下で 1-メチルアデニンを与えるとヒトデ卵の卵核細胞は消えるが第1極体が放出されない段階(図 1-III)でとどまるのが特徴である³⁾。そのほか、双方の細胞分裂を阻害する薬剤は細胞溶解剤など種々の化合物が存在するが、これらについてはすでに池上⁴⁾の考察がある。こうした結果を総合すると、ウニ受精卵とヒトデ未成熟卵を用いて DNA 合成、RNA 合成、タンパク質合成、微小管形成過程を阻害する化学物質を簡便に検出することができることになる(図 1)。

本研究では放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* の生産するペントピラニン C³⁾すなわち 1- α' -(3'-デオキシ-L-アラビノピラノシル)シトシンを用いて、ウニ胚とヒトデ卵を指標細胞としてタンパク質合成阻害剤と RNA 合成阻害剤を容易に分別することができることを例証する。この化合物をとり上げた理由はつ

ぎのとおりである。

ペントピラニン C についてこれまで報告された唯一の活性は、Ehrlich 腹水がん細胞において、 $[^3\text{H}]$ ウリジンの RNA のとりこみを阻害することである⁴⁾。これによって、ペントピラニン C は 5-アザシチジンとともに、RNA 合成阻害活性を有する生物起源のシトシン-ヌクレオシドと目されている⁵⁾。

この放線菌は同じ培養条件下で顕著なタンパク質合成阻害活性を有するシトシン-ヌクレオシド、プラストサイジン S を生産する⁴⁾。タンパク質合成阻害剤と RNA 合成阻害剤を同一の培養液中に産出することは興味深い現象であるが、これには何か必然の因果関係があるのだろうか。また、ペントピラニン C は著名な DNA 合成阻害剤、1- β -D-アラビノフラノシルシトシン(以下 Ara-C と略記する)とも構造上関連が深い(図 2)。細胞 DNA 合成におよぼすペントピラニン C の影響も考慮する必要があると思われる。

以下に述べる通り、ペントピラニン C は卵成熟と卵割の双方を阻害した。したがって、このヌクレオシドは選択的な核酸合成阻害剤とは考えられない。タンパク質合成におよぼす効果を調べた結果、細胞レベルにおいてペントピラニン C がタンパク質合成を阻害することが認められた。本研究の概要は、1979 年、口頭発表の形で日本生化学会大会において報告した⁶⁾が、本論文では研究の詳細について述べる。

2 実 験

2.1 実験動物

実験に用いたヒトデはイトマキヒトデ *Asterina pectinifera*、ウニはバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* である。これらは神奈川県で、それぞれの産卵時期に採集し、冷却循環海水(10~15°C)で飼育したものである。

2.2 試 薬

実験に用いた海水は浜浦自然海水(Natural sea water、以下 NSW と略記する)と人工カルシウム欠如海水(以下 CaFSW と略記する)である。後者は 2.3% NaCl、0.07% KCl、0.34% MgCl_2 と 0.21% MgSO_4 から構成されており、 NaHCO_3 を約 0.02% 用いて、pH 8.0~8.2 に調整したものである。

ペントピラニン A、B、C、D の調製は瀬戸⁴⁾の報告に基づいた。Ara-C はヤマサ醤油(千葉県銚子)から、シチジンと 1-メチルアデニンは Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri) から購入した。これらの試薬は直接、NSW に溶解させて生物検定に供した。

2.3 ヒトデ卵母細胞を用いた生物検定

雌ヒトデから十分に発達した卵巣をハサミで切り出し、卵巣片を CaFSW(20°C)中に浸す。卵巣を数回、新しい CaFSW に移し替え、1時間から1時間半の間、CaFSW 中に浸しておく。卵巣片を NSW に移すと、ただちにいちじるしい放卵が起こる。得られた卵を径 198 μm の穴をもつナイロン網を通過させ、卵と卵巣組織を分離する。卵はその周囲に卵胞細胞を失っており、卵核

4) H. Seto, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2415(1973).

5) R. J. Suhadolnik, *Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol.*, 22, 193(1979).

6) 池上 晋, 瀬戸治男, 加納和孝, 長野 弘, 真野嘉長, 生化学, 51, 919(1979).

3) H. Seto, N. Ōtake, H. Yonehara, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2421(1973).

Fig. 2 Structures of pentopyranines

胞をもつ未成熟卵であるが、この時点で検鏡し、卵核胞をもたない卵が 15% 以上を占めたり、卵の大きさが不揃いの場合には、これらの卵を棄て、別の個体から同様の操作で未成熟卵を得る。

こうして得られた卵は手まわし遠心機を用いて 2 回、NSW で洗う。1-メチルアデニンを 1 ml あたり 150 ng ($1 \mu\text{mol/l}$) 加えると、これらの卵は同調的に減数分裂が進行する。20°C で 1-メチルアデニン処理後、60 分で第 1 極体が放出され、130 分で第 2 極体の形成が認められる。さらに 30 分程度経過すると雌性前核が認められるようになる。1-メチルアデニン 150 ng/ml を含む試料 NSW 溶液 0.4 ml 中に入れられた卵の成熟過程を光学顕微鏡で観察した。

2.4 ウニ胚を用いた生物検定

雄ウニの体腔内に 0.5 mol/l KCl を注入して放出される精子は NSW で希釈せず、使用時まで冷所に保存した。雌ウニの体腔内に 0.5 mol/l KCl を注入して放出される卵は、手まわし遠心機を用いて NSW で 3 回洗う。媒精後、20°C で 90 分のうち第 1 卵割が起こり、さらに 30 分後に第 2 卵割が認められる。受精後まもなく受精膜が形成されるが、これを確認したのち、受精後 5 分以内に、0.4 ml の試料 NSW 溶液中に受精卵を少量加え、形態変化を光学顕微鏡で観察した。

2.5 ウニ胚の高分子合成

2.5.1 ウニ胚における DNA 合成量の測定：パフンウニ卵を受精させ、20°C で囊胚期に至るまで（約 16 時間）NSW 中で飼育する。7000 個の胚を [^3H]チミジン (24 Ci/mmol, RCC 社製) $1 \mu\text{Ci}$ と一定量のペントピラニンCあるいはシチジンを含む 1 ml 中で 24°C に置く。20 分後、最終濃度が 10% (w/v) となるように 100% (w/v) のトリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、1500 rpm, 10 分遠心して沈殿を集める。沈殿に 5% (w/v) のトリクロロ酢酸を加え、1500 rpm, 5 分間遠心を 3 回くり返して洗浄する。沈殿に 1.5 ml, 5% (w/v) のトリクロロ酢酸を加え、15 分間沸騰水浴上で加熱し、冷却後、1500 rpm, 15 分間遠心して上清 1.0 ml を得、Triton X-100 を含むトルエン系シンチレーター 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。

2.5.2 ウニ胚における RNA 合成量の測定：パフンウニ囊胚 7000 個を [^3H]ウリジン (46 Ci/mmol, RCC 社製) $1 \mu\text{Ci}$ と一定量のペントピラニンCあるいはシチジンを含む 1 ml の NSW 中で 24°C, 20 分間放置する。最終濃度が 10% (w/v) となるように 100% (w/v) のトリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、1500 rpm, 5 分遠心する。沈殿に 6 ml の 10% (w/v) のトリクロロ酢酸を加え、1500 rpm, 5 分遠心することによって 4

回洗浄する。沈殿を 3 ml の 0.5 N NaOH に懸濁して、37°C に一夜放置する。この液に 100% (w/v) のトリクロロ酢酸を最終濃度 10% (w/v) になるように加える。1500 rpm, 10 分遠心し、上清 1 ml を得、この放射活性を DNA 合成の場合と同様の手法で測定する。

2.5.3 ウニ胚における核酸前駆体の細胞膜透過率の測定：パフンウニ卵を受精させ、18°C で 1 時間放置し、胚を手まわし遠心機で集める。4500 個の胚を一定量のペントピラニンCあるいはシチジンと、[^3H]チミジンあるいは [^3H]ウリジン 0.25 μCi を含む 1 ml の NSW に、チミジンを加えた場合は 15 分、ウリジンを加えた場合は 10 分放置する。0°C に冷した NSW を過剰量加え、500 rpm, 1 分遠心して胚を集める。2 回、0°C の NSW で胚を洗ったのち、0°C に冷した 5% (w/v) トリクロロ酢酸 1 ml を加え、2000 rpm, 10 分遠心して上清 0.8 ml を得る。この放射活性を測定する。

2.5.4 ウニ胚におけるタンパク質合成量の測定：72000 個のパフンウニ未受精卵を [^3H]L-ロイシン (2 Ci/mmol, Schwarz 社製) $2 \mu\text{Ci}$ を含む NSW 8 ml 中に 10 分間放置し、手回し遠心機を用いて 8 回、卵を新しい NSW で洗浄し 8 ml の NSW に懸濁した。これらを媒精し、受精卵 4500 個を手まわし遠心で集め、一定量のペントピラニンCを含む 1 ml の NSW 中 20°C で培養する。受精後 45 分経過した時点で、最終濃度 10% (w/v) になるように 100% (w/v) のトリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。1500 rpm, 10 分遠心して沈殿を得る。沈殿を 10 ml の 10% (w/v) トリクロロ酢酸を用いて 1500 rpm, 5 分の遠心によって 2 回洗浄後、3 ml の 99% エタノールを用いて、500 rpm, 10 分の遠心によって 1 回洗浄する。沈殿分画を風乾して十分にエタノールを除き、0.5 ml の 1 mol/l "Hyamine hydroxide"-メタノール溶液を加え 60°C で 1 時間加熱して溶解する。10 ml の Triton X-100 を含むトルエン系シンチレーターを加えて、この放射活性を測定する。

2.6 マウス白血病細胞 L-1210 の増殖

マウス白血病細胞 L-1210 (Flow Laboratories, Rockville, Maryland) を 1 ml あたり 8×10^4 個の細胞数で培養する。培養液は 1 ml あたり 0.6 mg のグルタミンと 50 μg のシステイン塩酸塩を含む Eagle の MEM 培地 (日水製薬, 東京) に 10% の仔牛血清 (和光純薬, 大阪) を加えたものを用いた。これを 5% 二酸化炭素を含む空気を気相とするインキュベーター内で、37°C の温度で培養した。ペントピラニンCを一定量培地に加えて 96 時間培養したあと、細胞数を数えて増殖の阻害率を算出した。

3 実験結果

3.1 棘皮動物胚の有糸体細胞分裂と卵成熟分裂におよぼすペントピラニンCおよびその他のシトシン-ヌクレオシドの影響

バフンウニ受精卵の第1卵割におよぼすペントピラニンA, B, C, D, Ara-C, シチジンの効果を調べた結果を表1に示す。第1卵割を50%阻害するペントピラニンCの濃度は約5mmol/lであった。その他のヌクレオシドは40mmol/lの濃度でウニ胚の第1卵割を阻害するものはなかった。

Ara-Cは40mmol/lの濃度で第1, 第2卵割を阻害しないが, その後の卵割には影響を与え, 受精後240分でコントロール胚が16-細胞期のとき, Ara-C処理胚は4-ないし8-細胞期に達する。これは, Ara-Cが細胞内でリン酸化を受け, Ara-C-三リン酸となり, これがDNA合成の基質の一つ, デオキシシチジン-三リン酸と拮抗してDNAポリメラーゼ反応を阻害するのである。バフンウニ未受精卵ではDNA合成の基質となるデオキシリボヌクレオシド-三リン酸のプールがいちじるしく大きい⁷⁾。したがって, 最初はAra-C-三リン酸が有効にDNA合成を抑制することはないが, 数回のDNA合成を経てプール量が減少し, Ara-C-三リン酸がDNA合成を阻害して, 卵割が阻止されるようになる。ちなみに, 別種のウニ, タコノマクラ受精卵では, Ara-Cは0.5mmol/lで第1卵割を抑制する¹⁾が, これは細胞内のデオキシシチジン-三リン酸のプールがバフンウニ受精卵のそれよりも小さいことに起因するものと思われる。

各種シトシン-ヌクレオシドのヒトデ卵成熟におよぼす影響を調べた結果を表2に示した。ペントピラニンCは5mmol/lでイ

トマキヒトデの卵成熟を約50%阻害した。しかし, ペントピラニンA, B, D, Ara-C, シチジンは40mmol/lで卵成熟を阻害しなかった。

以上の結果から, ペントピラニンCはウニ胚有糸体細胞分裂, ヒトデ卵の減数的成熟分裂を同程度に抑制することが明らかとなった。これはペントピラニンCのRNA合成阻害活性に帰属することでは説明のつかない生物活性である。RNA合成阻害剤アクチノマイシンDはウニ初期胚の卵割に影響をおよぼさない¹⁾。また, ヒトデ卵成熟過程にもアクチノマイシンDの影響は認められない¹⁾。したがって, ペントピラニンCの細胞分裂阻害活性の原因はRNA合成系とは別の点に求められるべきである。そこで, ウニ胚のDNA合成, RNA合成, タンパク質合成におよぼすペントピラニンCの効果を逐一調べた。

3.2 バフンウニ胚のDNA合成, RNA合成におよぼすペントピラニンCの影響

前に述べたとおりウニ受精卵のRNA合成はきわめて低い。RNA合成がさかんになるのは囊胚以後である。そこでペントピラニンCのRNA合成におよぼす影響は囊胚において調べた。結果は図3に示すとおり, [³H]ウリジンのRNA画分へのとりこみはペントピラニンCでいちじるしく阻害された。ペントピラニンCはヌクレオシドの1種であるので, この成績は真のRNA合成阻害のほか, [³H]ウリジンの細胞内への透過を阻害している可能性も考慮する必要がある。そこでバフンウニ受精卵への[³H]ウリジンの透過におよぼすペントピラニンCの影響を調べた。その結果, 図3に示すとおり, [³H]ウリジンの酸可溶画分へのとりこみはペントピラニンCで阻害され, その阻害の程度は酸不溶性RNA画分へのとりこみ阻害にほぼ等しい。したがって, ペントピラニンCは細胞のRNA合成を阻害するのではなく, 細胞への[³H]ウリジンのとりこみを阻害するものと結論される。

[³H]チミジンの酸不溶性DNA画分へのとりこみもペントピラニンCで抑制されるが, これも[³H]チミジンの細胞膜透過が阻害されることに基づくものである(図4)。

ペントピラニンCは低濃度でヌクレオシドの細胞膜透過を阻害

Table 1 Effects of pentopyranine C and other cytosine nucleosides on the first cleavage of fertilized *Hemicentrotus pulcherrimus*

Nucleosides	Range of minimum effective concentrations (mmol/l) to inhibit cleavage ^{a)}
Pentopyranine A	>40
Pentopyranine B	>40
Pentopyranine C	4~6
Pentopyranine D	>40
Ara-C	>40
Cytidine	>40

a) Obtained by 4 separate experiments.

Table 2 Effects of pentopyranine C and other cytosine nucleosides on maturation of *Asterina pectinifera* oocytes induced by 1-methyladenine (1μmol/l)

Nucleosides	Range of minimum effective concentrations (mmol/l) to inhibit oocyte maturation ^{a)}
Pentopyranine A	>40
Pentopyranine B	>40
Pentopyranine C	4~6
Pentopyranine D	>40
Ara-C	>40
Cytidine	>40

a) Obtained by 4 separate experiments.

7) N. Suzuki, Y. Mano, *J. Biochem. (Tokyo)*, 75, 1349 (1974).

Fig. 3 Effects of pentopyranine C on incorporation of [³H]uridine into the acid-insoluble RNA fraction of *Hemicentrotus pulcherrimus* gastrula (●) and into the acid-soluble fraction of the embryo at the 1-cell stage (○)

Details of experimental procedures are described in the experimental section.

Fig. 4 Effects of pentopyranine C on incorporation of [^3H]thymidine into the acid-insoluble DNA fraction of *Hemicentrotus pulcherrimus* gastrula (●) and into the acid-soluble fraction of the embryo at the 1-cell stage (○)

Details of experimental procedures are described in the experimental section.

Fig. 5 Effect of pentopyranine C on protein synthesis of fertilized *Hemicentrotus pulcherrimus* eggs that was preloaded with [^3H]L-leucine

Experimental procedures are described in the experimental section.

するものの DNA 合成, RNA 合成そのものを阻害するものではない。この事実はペントピラニンCがヒトデ卵成熟とウニ胚卵割の双方を、ほぼ同濃度で阻害することと矛盾するものではない。シチジンは 40 mmol/l でウニ胚卵割を抑制しない(表1)が、 ^3H チミジンと ^3H ウリジンの細胞膜透過はいずれもほぼ 100% 阻害された。したがって、ペントピラニンCの細胞分裂抑制活性はタンパク質合成阻害など、ヌクレオシドの細胞膜透過阻害以外の原因に帰すべきものと思われる。

3.3 ペントピラニンCのタンパク質合成阻害活性

ウニ受精卵のタンパク質合成におよぼすペントピラニンCの作用を調べた。ペントピラニンCが ^3H L-ロイシンの細胞膜透過を阻害することによって、見かけ上、タンパク質合成阻害活性を示す可能性を除外するため、未受精卵にあらかじめ ^3H L-ロイシンをとりこませ、そのあと十分 NSW で卵を洗って受精させてタンパク質合成を誘起した。このタンパク質合成はペントピラ

Fig. 6 Effect of pentopyranine C on growth of L-1210 cells cultured *in vitro*

Experimental procedures are described in the experimental section.

ニンC 10 mmol/l によって 65.4% 阻害された(図5)。したがって、ペントピラニンCは真のタンパク質合成阻害作用をもつことになる。パフウニ受精卵においても受精卵とはほぼ同程度のタンパク質合成阻害活性を示した(データはここでは示さない)。

3.4 哺乳類培養細胞の増殖におよぼすペントピラニンCの影響

これまでに述べた結果から、ペントピラニンCはウニ胚のタンパク質合成を阻害することによって細胞分裂を阻止するものと考えられる。哺乳類がん細胞も、タンパク質合成を阻害すれば細胞増殖が阻止されるので、がん細胞の分裂におよぼすペントピラニンCの影響を調べた。図6に示すとおり、マウス白血病細胞 L-1210 の増殖はペントピラニンC、0.4 mmol/l で 68% 阻害された。ペントピラニンCには抗バクテリア、抗カビ作用がまったくないことが知られている⁴⁾ので、ペントピラニンCの細胞分裂阻害作用は動物細胞に特異的であると思われる。

4 考 察

著者らはさきに、ヒトデ卵とウニ胚を用いた複合生物検定によって DNA 合成阻害剤を検索し、ジテルペン-テトラオールの一環、アフィディコリンを見いだした⁸⁾。アフィディコリンは染色体 DNA 合成をとまなわないうヒトデ卵の減数的成熟分裂を阻害せず、染色体 DNA 合成を必要とするウニ胚有糸体細胞分裂を阻害した。アフィディコリンは RNA 合成、タンパク質合成を阻害せず、選択的に DNA 合成を阻害した。ウニ胚 DNA 合成酵素のうち、DNA ポリメラーゼ α 活性はアフィディコリンによって顕著な阻害を受けたが、DNA ポリメラーゼ β および γ 活性はまったく阻害されなかった。それゆえ、DNA ポリメラーゼ α が染色体 DNA 複製にかかわる酵素であり、アフィディコリンの標的分子であると結論された⁸⁾。

ウニ胚におけるアフィディコリンの作用はマウス骨髓腫、マウスがん化肥満細胞、マウス乳がん細胞、ヒト子宮頸部がん細胞などのがん細胞および DNA ポリメラーゼで追証された⁹⁾。その結

8) S. Ikegami, T. Taguchi, M. Ohashi, M. Oguro, H. Nagan, Y. Mano, *Nature*, 275, 458(1978).

9) 長野 弘, 池上 晋, 生化学, 52, 1028(1980).

果、ウニ胚にとどまらず哺乳類がん細胞においても DNA ポリメラーゼ α が「複製」酵素であり、アフィディコリンによって選択的に阻害を受けることが明らかにされた。

今日、臨床に用いられる制がん剤の多くは、がん細胞の DNA 合成を阻止し、細胞増殖を抑制することに作用機作が求められるものが多い。新しい DNA 合成阻害剤アフィディコリンの制がん作用が調べられた。その結果、アフィディコリンが大腸がん、その他に制がん効果を示すことが認められた⁹⁾。これらの結果からウニ胚、ヒトデ卵を用いた複合生物検定法が DNA 合成阻害剤の検索に有用であり、制がん剤の開発にも利用することができると思われる。

制がん剤には DNA 合成阻害をその作用機転とするもののほかに、微小管形成阻害活性、すなわち細胞内チューブリンの重合阻止によってがん細胞の増殖を阻害するものがある。ポドフィロトキシンやビンブラスチンなどがその例である。こうした微小管形成阻害剤はウニの第 1 卵割を阻害し、ヒトデの卵成熟過程を第 1 減数分裂中期で阻止する特徴がある (図 1)。

著者らは、この特性を利用して多数の植物成分の裡に微小管形成阻害剤を検索した。その結果、エレミシンがヒトデ卵の卵核胞崩壊を阻止しないが極体の放出を阻止した²⁾。また、ウニ受精卵の第 1 卵割も阻止する。さらに、ウニの脱纖毛囊胚の纖毛再生を阻止する。ウニ胚の纖毛再生過程は微小管形成阻害剤によって選択的に阻害を受ける。以上の結果は、エレミシンが新しい微小管形成阻害剤である可能性を示唆する²⁾。最後に、エレミシンが試験管内で実際にチューブリンの重合を阻止するかどうか調べられた。その結果、ブタ脳チューブリンがエレミシンによって重合を阻止された。こうしたことから、ヒトデ卵とウニ胚を用いた複合生物検定法が微小管形成阻害剤の検索に有効であることが実証された。本論文ではさらに、ウニ胚とヒトデ卵を用いることによ

って、容易に RNA 合成阻害剤とタンパク質合成阻害剤を分別しうることを示した。

四方を海に囲まれたわが国では、海浜に群れるウニやヒトデを採集することは比較的容易である。また、これらの動物は飼育がやさしいので学校教材にもしばしば用いられている。多くの有機化学の研究室のデシケーターには、貴重な天然有機化合物や合成化合物が、正当な生物活性の評価をうけないまま、ひそかに眠っているに違いない。ウニ胚とヒトデ卵を用いる複合生物検定法は 2 時間前後の比較的短い時間で、多数の検体を評価しうる有用な手法であり、これを用いて核酸合成、タンパク質合成、チューブリン重合反応といった、細胞にとってもっとも基本的な生反応を選択的に阻害する化合物が見いだされてくるものと期待される。

5 結 論

(1) ペントピラニン C は 5 mmol/l でバフンウニ胚の第 1 卵割とイトマキヒトデの卵成熟 (卵核胞崩壊) を約 50% 阻害した。しかし、ペントピラニン A, B, D, Ara-C, シチジンは 40 mmol/l でウニ胚の第 1 卵割とのイトマキヒトデの卵成熟の双方に影響を与えなかった。

(2) ペントピラニン C は 10 mmol/l でバフンウニ胚のタンパク質合成を 65.4% 阻害した。しかし、従来報告されたペントピラニン C の RNA 合成阻害は、ヌクレオシドの細胞膜透過阻害による見かけ上のものであり、真の核酸合成に対してペントピラニン C は影響を与えなかった。

(3) マウス白血病細胞 L-1210 の増殖はペントピラニン C, 0.4 mmol/l によって 68% 阻害された。

(4) 以上の結果から、ウニ胚とヒトデ卵を用いることによって、容易に RNA 合成阻害剤とタンパク質合成阻害剤を分別しうることを示された。

Special Articles on Biologically Active Substances

A Convenient Procedure for the Detection of Inhibitors of Macromolecule Biosynthesis Using Oocytes and Embryos of Echinoderms —Inhibition of Protein Synthesis by Pentopyranine C—

Susumu IKEGAMI*, Haruo SETO**, Kazutaka KANO***,
Hiroshi NAGANO*** and Yoshitake MANO***

*Department of Applied Biochemistry, Hiroshima University; Midori-machi,
Fukuyama-shi 720 Japan*

** *Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo; Yayoi, Bunkyo-ku,
Tokyo 113 Japan*

*** *Department of Physiological Chemistry and Nutrition, Faculty of Medicine,
University of Tokyo; Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan*

In early sea urchin embryos, maternal messenger RNA synthesized during oogenesis plays a central role in translation. Protein synthesis occurs in the presence of inhibitors of RNA synthesis such as actinomycin D. The cleavage divisions require protein and DNA synthesis. On the other hand, starfish oocytes undergo meiotic maturational divisions in the presence of inhibitors of RNA and DNA synthesis. The maturational process is prevented by inhibitors of protein

synthesis. Therefore, one can distinguish between inhibitors of RNA synthesis and those of protein synthesis by using sea urchin embryos and starfish oocytes.

Effects of pentopyranine C, *i. e.* 1- α -(3'-deoxy-L-arabinopyranosyl)cytosine were examined on mitotic divisions of sea urchin embryos and on meiotic maturational divisions of starfish oocytes. The only known action of pentopyranine C is to suppress the uridine incorporation into RNA in Ehrlich ascites cells. It was revealed that both cell divisions were susceptible to the drug application. Biochemical analyses using labeled nucleosides have shown that pentopyranine C does not inhibit the biosynthesis of nucleic acids in sea urchin embryos although incorporation of the nucleosides into the cells is suppressed. Pentopyranine C inhibited protein synthesis in fertilized sea urchin eggs that had been preloaded with a labeled amino acid. Thus, the bioassay method as proposed in this study has been shown to be efficient in distinguishing between inhibitors of RNA synthesis and those of protein synthesis.