ウニ胚の初期発生解析に基づく細胞分裂阻害物質の

検索と化学的研究†

(昭和 61 年度農芸化学奨励賞受賞)

小 林 昭 雄

(岡山大学農学部)

今までに天然物化学者の努力によって、生物の生命活動にかかわる多くの謎が物質レベルで次々と解き明されてきており、とくに近年、分析機器のめざましい進歩に伴い超微量で活性物質の化学構造が明らかにされる現状となった。また、生物化学的な知識の集積は、生体内成分の役割と活性物質の作用発現機構を分子レベルで解析することを可能としてきている。

このような状況下、天然物化学を志向した生物有機化学の分野において、いかなる「探り針」を用いて、新しい機能をもった生理活性物質を見出すかは重要な課題である。また、バイオテクノロジーの発展に伴い細胞レベル・分子レベルでの活性発現機構の解明をめざした新たな展開が望まれている。このように、生理活性を有する分子と生体との細胞レベルでの接点を微視的に解析するうえで *in vivo* 系の最小単位である細胞系の活用が示唆されてきた。

このような観点から、筆者は、ウニ胚を細胞モデルとして、その発生・分化に影響を与える物質を微生物代謝産物を中心に検索を試みている。

本文では、ウニ胚の初期発生に及ぼす種々の細胞分裂阻害物質および筆者らが確立した生物試験法によって得られた微生物起源細胞分裂阻害物質について、その作用機作を含めて概説したい。

細胞モデルを使って細胞分裂阻害活性を有する、いわゆる細胞毒成分の検索は多くの謎に包まれた細胞の分裂機構の解明のための化学的プローブの発見を第1目的と

して進展してきたというより、むしろ、抗癌性物質の開発の第1次スクリーニングとして広く受け入れられてきている。この目的には、ガン組織由来の KB 細胞や HeLa 細胞、HEP 2 細胞などの培養細胞やマウスの生体を利用したマウス白血病 L 1210, L 5178 細胞株が広く用いられている⁽¹⁾。このような体細胞由来の培養細胞に対する増殖阻害活性とは異なり、多様な分化能を持った胚細胞に対する細胞毒の阻害様式は、発生過程での著しい形態形成に対する影響におきかえて評価することができる。とくに初期発生過程における細胞毒成分の阻害様式とその作用機作との間には多くの相関性を見出すことができるため、胚の形態変化を指標としてその作用機作を一義的に予測することが可能である。

1. 細胞モデルとしてのウニ胚の特徴

有性生殖によって増える動物において新個体を生じるための第1段階は、卵と精子の合体と核の融合、それに引き続く高次の生体反応の制御にあり、受精によって賦活化された胚は器官分化を伴い細胞分裂を繰り返し発生を完了する。とくに、胚の初期発生の段階では分裂周期は明瞭で受精後核酸・蛋白合成、さらに染色体や細胞小器官の分配が分裂周期に呼応して進む。この段階は物理的、化学的刺激に敏感で、種々の代謝調節物質が特異的な阻害効果を発現しうる。このように一細胞から器官形成に至るまでの過程を解析するうえでいくつかの細胞モデルが考えられるが、なかでもウニ胚は優れた細胞モデルの一つである。すなわち、細胞周期がきわめて正確なこと、同時に得られた数万~数十万の胚が同調的に分裂を繰り返すため、抜き取り実験が容易にできること、細胞が 90~100 μm と大きく透明度の高い胚では光学顕微鏡によって細胞内部の変化を動的に観察できることな

† Screening for Cell Proliferation Inhibitors Using Sea Urchin Embryo Assay System and Their Chemical Structures.
Akio KOBAYASHI (Faculty of Agriculture, Okayama University, Tsushima, Okayama 700)

図1 ウニ胚を用いた生物試験法と初期発生

ど特筆すべきいくつかの利点を持っている。

ウニは雌雄異体であり容易に人工的に受精させることができる。また、種類によって生殖時期が異なり、種を選ぶことによりほぼ常年卵(胚細胞)と精子を得ることができる(図1)。

2. ウニ胚の形態変化を指標とした細胞分裂阻害物質の検索法

受精卵はバフンウニの場合、18°C 90 分ほどで最初の分裂を完了する。その後、約 60 分ごとに分裂を繰り返し8細胞期までは等割球を生じるが、16細胞期には割球は不等価となり Mesomere (8 cells), Maeromere (4 cells), Micromere (4 cells) の3つの細胞群に大別され明確な分化の方向が決定される。

胚細胞内の蛋白・核酸合成は、細胞周期と密接な関係を有しており、とくに DNA 合成はきわめて明瞭であり、胚の形態変化と結びつけて解析することができる

図2 ウニ胚の初期発生における DNA 合成

(図2)。

そこで筆者は、薬理作用が明らかとされた代謝阻害剤の阻害効果(様式)を精査した。とくに脂溶性の代謝調節物質は一定の範囲内で同種の薬理作用が認められているものにあつては、阻害様式にかなりの共通性を見出すことができる。この知見は、ウニ胚を細胞モデルとして新しく細胞分裂阻害物質を検索するのに有用である。

3. 呼吸阻害と分裂阻害様式

ウニ胚の呼吸は、酸素電極法やワルブルグ(マノメーター)法によって直接測定することができる。チトクローム呼吸鎖の site I に作用する 2,4-dinitrophenol は、顕著な阻害活性を示さないがその誘導体 2,4-dinitroresol は 10^{-6} M 程度で可逆的に阻害する。site I を阻害するロテノン(1)や site II を阻害するアンチマイシン A (2)は著しい分裂停止効果を示す。これら呼吸阻害剤は阻害発現が速く細胞周期のどの段階においても、また発生の各段階で広く効果を示す。受精後 $0.5 \mu\text{g/ml}$

図3 酸素電極法を用いたウニ胚呼吸阻害活性

のアンチマイシンで処理すると、第1分裂は不可逆的に完全に停止する。

いく分高い濃度（数 $\mu\text{g}/\text{m}$ ）のロテノン処理では、hyaline layer（透明層）が剥離し特徴的な呼吸阻害効果が現れる。このような既知の呼吸阻害効果に基づき、微生物の代謝産物を検索し数種の呼吸阻害物質を得た。家畜の飼料より分離した *Aspergillus* 属の1菌株より2種の anthraquinones (physcion 3, catenarin 4) を単離同定した⁽²⁾。catenarin physcion は、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で受精直後の胚の分裂を阻害し、その阻害様式は 2,4-dinitrophenols との類似阻害効果を示した。とく

3 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$ physcion

4 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$ catenarin

に濃度を高めるとその効果は顕著で、透明層が剥離し細胞質は膨潤して細胞は斃死する。catenarin は、きわめて活性が高く 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で処理した胚は発生のより進んだ胞胚期に阻害効果が現れる。また、電極法で消費酸素量を測定すると著しい呼吸促進効果が認められた（図3）。

5 $R = \text{H}$
 $R = \text{OH}$
polyporic acid

6

7

さらに糸状菌より terphenylquinones (5, 6, 7) を得た。これらは、いずれも数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でウニ胚の分裂を阻害する。とくに、5 の水酸基にメチル基などの疎水基を導入すると活性は約 10 倍増大する。前述の anthraquinones と同様、胚には処理後数時間で透明層の剥離が認められる。化合物 5 およびその hydroxy 体 (polyporic acid) から誘導されるユニークなキノンメタイド構造を持った 6, 7 は、呼吸鎖以外に作用部位を持つことが阻害様式から示唆された⁽³⁾。

4. 核酸合成阻害物質と阻害様式

ウニ胚における DNA 合成能は細胞周期と密接な関係にある（図2）。トレーサー実験により8細胞期までは、かなり正確に追跡できる。DNA 合成阻害剤のなかには、DNA ポリメラーゼ自身に作用する aphidicolin や DNA 鎖に挿入し、DNA ポリメラーゼの機能を阻害する mitomycines 等がある。aphidicolin (20) は、抗ウイルス活性を有する糸状菌の生産するテルペンで、ウニ胚に対しても 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で顕著な阻害効果を示す^(4,5)。受精後 25 分以内に処理すると、核膜は崩壊せず紡錘体も構築されない。一方 mitomycin C (8) は、生体内で還元され semiquinone ラジカルを生じ DNA と

図4 Candidusin B によるバフンウニ胚異常分裂

架橋を形成する⁽⁶⁾。ウニ胚の分裂は $1.0 \sim 5.0 \mu\text{g/ml}$ で停止する。しかし、第1分裂を停止する限界濃度は、明確でなく上述の下限濃度では、阻害発現は、桑実胚まで遅延する。

5. *Aspergillus candidus* の生産する核酸合成阻害物質

穀物由来の本菌の振盪培養液は顕著な発生阻害効果を示した。培養液の酢酸エチル抽出物の阻害様式は、DNA 合成阻害剤である mitomycin C の活性と似ており、発生が進んだ桑実胚・胞胚期に阻害活性が現れる(図4)。各種クロマトグラフィーにより精製を繰り返して、本菌より candidusin A (9), B (10) を含め4種の活性物質を明らかにした^(7,8)。³H-チミジン、ウリジンをを用いて最も活性の高い candidusin B の胞胚期細胞に対する核酸合成能を測定した。その結果、candidusin B は数 $\mu\text{g/ml}$ で DNA 合成をほぼ完全に阻害した。しかし蛋白合成阻害は全く認められない。ウニ胚に対する阻害活性は、DNA の2重鎖に挿入 [intercalation] され DNA の複製を妨害する ethidium bromide (11) と類似

図5 細胞模式図(中期)

の阻害活性を示す^(9,10)。以上より candidusins の阻害様式は、DNA 鎖への intercalation による核酸合成阻害と結論している⁽⁷⁾。

6. 分裂装置形成と微小管配向

分裂装置は真核細胞の分裂(有糸分裂)に必要な細胞小器官であって、染色体、紡錘体、中心体、星状体などから構成されている。S 期の間に複製された DNA は束ねられ生物種によって定まった数と形を持つ倍数の染色体(4n)となる。バフンウニの胚では、受精後90分目に第1回目の分裂がおき DNA 合成は核の融合が完了する受精後20分ころより活発となる。30分にはほぼ染色体の複製に必要な DNA の合成は完了する。一定の休止期(G₂期)後、分裂装置が構築され始める(図5)。分裂装置の主要構成成分であり、紡錘体の両極に位置する $0.16 \sim 0.4 \mu\text{m}$ の直交する1対の中心小体(centrioles)

図6 微小管重合模式図とウニ胚に対する紡錘体毒の影響

も同様この時期に複製される。中心体は星状体の中心に位置し、それを微小管重合中心 (MTOCs) が取り巻いている。複製された染色体は、M期を通じて紡錘体 (動物体微小管) により両極へたぐり寄せられる。M期の前期に作られ終期には消失する紡錘体は、以前から繊維状の紡錘型として染色像により視覚化されたが、高感度・高解像の偏光顕微鏡により分裂紡錘体の構築・解体過程を直接生の細胞系で観察できるようになった。偏光顕微鏡による視覚化は、紡錘体微小管の光学異方性に基づく構造屈折性に起因する。

7. 紡錘体の骨格をなす微小管

紡錘体の骨格をなす繊維状物質は、微小管といわれるまっすぐな中空の管状構造物である。紡錘体を構成する微小管は 13 本のプロトフィラメントからなり、径 25 nm, 長さ数 μm ~数十 μm のチューブ構造をなしている。微小管を形づくるプロトフィラメントは、チューブリンと呼ばれる分子量約 11 万の蛋白質のヘテロダイマー (長軸 8 nm, 短軸 5 nm) が縦方向に $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ と結合した管状構造物で $\alpha\beta$ 両鎖の分子量は電気泳動法により $55,000 \pm 2000$ と予想されているが⁽¹¹⁾最近ブタの脳チューブリンの α 鎖, β 鎖の 1 次構造が決定され、それぞれ 450, 445 のアミノ酸残基からなることが報告された⁽¹²⁾。それぞれの鎖の 1 次構造は種間で大きな違いはない。しかし微細な 1 次構造の変化は、高次構造に変化を与え後述する核毒に対する感受性に大きな違いを生ずる。

微小管は、その構造から基本となるプロトフィラメントの数が異なる 3 種に分類される。なかでも紡錘体の骨格をなすシングレット微小管は、細胞質微小管と呼ばれ纖毛・中心体等を形成する他の二種と大きく性質を異にしている。細胞質微小管は細胞分裂阻害物質の最も効果的な標的となりうるため、その物理・化学的性質の把握が重要となる。シングレット微小管は、低温処理、カル

シウムイオン、高圧処理で解体する。また、後述するコルヒチン (12) などの核毒 (紡錘体毒) や SH 基阻害剤によっても容易に脱重合する (図 6)。また、カルシウムイオンによって容易に脱重合するが紡錘体を取り巻く環境下の Ca^{2+} 濃度の調節には、カルシウム受容蛋白質 (MW ca. 18,000) カルモジュリンが関与している。カルモジュリンは Ca^{2+} 存在下ホスホジエステラーゼ, ATPase などの酵素を活性化させることが知られてい

13 W-5

14 trifluoperazine

る。カルモジュリンの阻害剤としては W-5 (13) や trifluoperazine (14) などが知られており、新しいタイプの細胞分裂阻害剤の標的として近年注目されている。

8. 既存の核毒のウニ胚分裂に対する影響

コルヒチン (12) はユリ科に属するイヌサフラン (*Colchicum autumnale*) の種子・鱗茎から抽出されるイソキノリンアルカロイドであり、化学構造が明らかとなったのは 1940 年代である。コルヒチンの細胞学的進展は、1934 年 Dustin がコルヒチン処理による染色体の増加によって巨大細胞が形成されることを見出した。また Gavandan はコルヒチン処理した根端細胞のなかに染色体数の増加したものがあることを見出し染色体の倍加は、紡錘体形成・紡錘体機能の阻害によって誘起されることを明らかにした。これらの発見は、コルヒチンが倍数体や複二倍体作成の主要な武器として利用されるための引き金となった。

また一方、1959 年 Went は蛍光抗体法により、分裂間期に存在する蛋白質は分裂装置を形成する繊維状骨格と免疫学的に同一物質であることを明らかにしている。この蛋白質は 1968 年毛利らにより、microtubule protein すなわち tubulin (チューブリン) と命名され

12 : R = COCH colchicine
: R = CH₃ colcemid

た^(13,14)この間、放射^(13,14)活性を有するコルヒチンを用いて細胞や組織を対象としてその結合能が調べられた結果、分裂活性を持たない脳組織に大量に取り込まれることや、HeLa 細胞やウニ胚の分裂装置・原生動物の纖毛に特異的に集積することが見出され、コルヒチンの集積位置とチューブリンの存在部位が正の相関関係にあることが明らかとなった。

9. コルヒチンの有糸分裂阻害活性

コルヒチンは、分裂細胞において約 10^{-8} M の低濃度で微小管重合を阻止し、その機能を止めて metaphase arrest 効果を示すと考えられている。

ウニ胚に対しては 5×10^{-5} M 程度で分裂阻害活性を示し、第1分裂は完全に阻止される。コルヒチン類縁体であるコルセミドはコルヒチンの10倍の活性を持っている。筆者らの確立したウニ胚を用いたアッセイ系(後述)では、受精35分後 5×10^{-5} M のコルヒチンで処理すると、第1分裂が完了する85~90分においてミニチュアサイズの紡錘体のままかあるいはほとんど紡錘体ができないままで停止した胚が見られる(図6)。また拡散希釈法によって有効濃度を下げるか UV 照射によって不活性型のルミコルヒチンに変換すると、やがて細胞のほぼ中心に4nの大きな核が現れる。また、ウシの脳由来のチューブリン重合阻止濃度(50% 阻止に必要な濃度)は、 2.3×10^{-7} M ときわめて強い。コルヒチンは、 $\alpha\beta$ ヘテロダイマー当り1分子結合することが放射活性を有するコルヒチンにより化学量論的に明らかとなり β 鎖上にはコルヒチンの結合に適した疎水性ポケットの存在することが示唆されている。

10. ビンブラスチンの有糸分裂阻害活性

ビンブラスチン(15)、ビンクリスチン(16)はキョウ

15: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{COCH}_3$ vinblastine

16: $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{COCH}$ vincristine

$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$ vindesine

チクトウ科植物 *Catharanthus roseus* の種子の薬効成分として得られたアルカロイドであり、マウスの白血病 P-1534 leukemia にきわめて低濃度〔数 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 〕で有効であることが見出された。ビンカアルカロイドの抗癌活性の発見は、関連化合物の単離や構造解析、合成研究、さらに、その作用機作の解明のための薬理学的研究の進展に拍車をかけた⁽¹⁵⁾。

ビンブラスチンは、*in vitro* 系において $0.1 \sim 1.0 \times 10^{-5}$ M で微小管を脱重合する。ウニ胚に対してもきわめて強い分裂阻害活性を示し、 5×10^{-6} M 程度で、すでに形成された前中期 (prometaphase) の紡錘体をすみやかに短縮させ、処理時間を早めると紡錘体の形成は認められない。その作用はコルヒチンより強力であり、作用部位はコルヒチンとは異なる。脳由来のチューブリン分子には、親和性を異にする二つの部位が存在し、高い親和性を示す部位は重合に、低い親和性を示す部位はチューブリンの凝集に関与するとされている。ウニ胚などチューブリンブールの大きい細胞を比較的高濃度のビンブラスチン (0.1 mM) とコルヒチン (0.1 mM) で同時に処理すると細胞内に生体結晶 (ビンブラスチン-バラクリスタル) が生じる (図7)。この結晶は複屈折量が大きいため偏光顕微鏡によって鮮明に見ることができる⁽¹⁶⁾。結晶は、六角形のチューブ (長さ: $8 \mu\text{m}$, 直径: $27 \sim 28 \text{ nm}$) の集合体で安定であり単離することができチューブリン純度が高いため抗体を調製するのに使われた。このユニークな活性は、新規有糸分裂阻害剤のチューブリン分子上での作用部位を考慮するうえで示唆的である。

11. この他の天然紡錘体毒の分裂阻害作用

a. ポドフィロトキシンの活性

ナギ科植物 *Podophyllum peltatum* の抽出液は、イボの治療に民間薬として使われて19世紀後半には皮膚ガンの治療薬としてもにも使われ、抗ガン活性が目されるようになった。その活性成分は、ポドフィロトキシン

17: podophyllotoxin

図 7 Vinblastine によるチューブリンの生体結晶
0.1 mM vinblastine および 0.1 mM コルヒチン処理によるパラクリスタルの誘導。

(17) を成分とする C_6-C_3 単位からなるリグニン類である⁽¹⁷⁾。これらの化合物は、*in vitro* 系でチューブリン重合を $0.5 \sim 1.0 \times 10^{-6} M$ で阻害する。3 個のメトキシ基、1,2,3-トリメトキシフェニル基および一定の間隔で π 電子系に富むベンゼン環が存在する点でコルヒチンと構造的に類似しており、チューブリン上の作用部位はコルヒチンとの拮抗反応からコルヒチン、ステガナシンと同一の疎水性ポケットかその近傍であると考えられる。

しかし、チャイニーズハムスターの卵巣細胞由来の突然変異株の中にコルヒチンに対する感受性は保持されるがポドフィロトキシンには抵抗性を示すものが見出されている。変異株ではチューブリン分子の β 鎖のアミノ配列が異なることから、ポドフィロトキシンの作用部位は β 鎖上であるとされている。ウニ胚に対する分裂阻害効果はコルヒチンよりはるかに強く、受精後 35~40 分目に $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-6} M$ で処理すると紡錘体の形成はほぼ完全に抑制される。しかし、ポドフィロトキシンは中期の紡錘体には顕著な阻害効果を示さず、すでに形成されている微小管への作用は温和である。

b. メイタンシンの活性

メイタンシン (18) はニシギキ科植物 (*Celastraceae*) から得られたアンサマイシン系抗生物質に似たアルカロイドの 1 つで^(18,19) マウスの白血病 (leukemia P-388) に $\mu g/kg$ オーダーの低濃度で有効であり有効濃度範囲が広い⁽²⁰⁾。メイタンシンは $10^{-6} M$ で *in vitro* チューブリン系での重合を阻害し、ビンブラスチンとチューブリン上

18 : $R_1 = COCHMeNMeCOMe$,
 $R_2 = OH$, $R_3 = H$ maytansin

の結合部位を拮抗する。しかし、チューブリン分子に吸着したメイタンシンは置換を受けやすいが、ビンブラスチンでは完全に置換されず残ることから結合位置は同一でなく互いにオーバーラップしている可能性が示唆される。また、メイタンシンの特異な部分構造：環状カルビノールアミド系のチューブリンの SH 基に対する高い反応性も、チューブリンの脱重合能と関連性を持つと思われる。メイタンシンはウニと二枚貝の卵の発生をきわめて低濃度 ($10^{-8} \mu M$) で阻害し⁽²¹⁾、中期での分裂停止効果を示す。バフンウニ胚に対する分裂阻害効果は、コルヒチン、ビンブラスチン等に比して温和で streak 期の処理では紡錘体は消失しないで残り、丸味を帯びて縮小する。メイタンシンには受精直後の有効濃度と streak 期での分裂阻止濃度に大きな差が認められ、他の紡錘体毒とその作用を異にする。

12. タキソールの新しい細胞分裂停止効果

タキソール (19) は、イチイ科植物 (*Taxus brevifolia*) から単離された抗腫瘍性ジテルペンであり⁽²²⁾、

19 taxol

HeLa 細胞の増殖を $2.5 \times 10^{-7} M$ で抑える。しかしながら、その微小管形成に対する効果は前述のコルヒチンに代表される紡錘体毒とは正反対であり、*in vitro* 系では著しい微小管形成促進効果を示すのみならず微小管を安定化させる。また、*in vivo* でも細胞骨格は安定を増すため、タキソールで処理した微小管は低温や Ca^{2+} 、ポドフィロトキシンに対し著しい抵抗性を示す。タキソール

は、コルヒチン・ポドフィロトキシンのチューブリン結合に影響を与えない。タキソールの結合部位はハムスターの変異株を用いた実験から α 鎖上にあると予想されている。タキソールは受精直後のウニ胚の第1分裂を 5×10^{-6} M で停止する。バフンウニの第1分裂期の streak 期に与えた場合、第1分裂が始まる受精後 80~90 分目にはほぼ 70% の胚に中期から後期の紡錘体が認められる。複屈折量で微小管量を測定すると 3.7 前後の対照値より幾分大きい値が得られ、わずかながら微小管の過配向効果が認められる。受精後約 25 分目までに処理すると α -DNA ポリメラーゼ阻害剤である aphidicolin (20) とよく似た効果が認められ、核膜の崩壊は起こらない。これは S 期の DNA 合成が微小管配向と共役していることを支持する 1 例と思われる。

20 aphidicolin

13. 有糸分裂阻害物質の検索

コルヒチン様活性を有する物質の検索は、細胞分裂の盛んなソラマメやネギの根端細胞に対する阻害効果を指標とし、一定時間処理後固定・染色して分裂像を顕微鏡下観察する方法をとる。しかし、細胞周期が長いため高頻度で中期分裂像を認めがたく、蛋白・核酸合成阻害剤による効果と区別するのは難しい。in vivo 系での試験

図 8 バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の分裂周期と対応するタマネギ根端細胞の分裂像。CE, 中心体; CF, 分裂溝; CH, 染色体; IM, 極間連絡微小管; K, 動原体; KM, 動原体微小管; MB, 細胞膜; NE, 核膜断片; PM, 星状糸微小管 [薬剤処理点: Streak 期 (受精後 35~40 分)]

としてはマウスなどの体内での増殖阻止効果を指標とすることもできるが、抗ガン活性・細胞毒活性は必ずしも有糸分裂阻害活性とは結びつかない。したがっていくつかの検索法を組み合わせる必要がある。しかし、有糸分裂にとって必須な機能を担う分裂装置の構築・解体過程を動的に解析することによって、直接有糸分裂阻害物質を検索することができる。すなわち、分裂装置を構成する中心体・星状体・紡錘体・染色体の動向はウニ胚のような大きくて透明度の高い細胞を用い、高解像能偏光顕微鏡により解析することができる。筆者は、ウニ胚細胞を用いた有糸分裂阻害試験法を確立するために既存の紡錘体毒の阻害効果を詳細に検討し、有糸分裂阻害活性を増幅して解析するための薬剤処理点を設定した(図8)。一般に生理活性物質の多くは多用性で至適濃度を越えると付随効果が現れるため、目的とする作用を明確につかむことが難しくなる。パフンウニの胚細胞(20°C)では、受精後35~40分の間が処理点として適当で有効濃度も広くとることができる。

in vitro チューブリン系を用いた検索法も可能であるが、多量の新鮮なチューブリンが必要であることや無機

イオンなどの夾雑物の存在下での解析は困難であるため、スクリーニングとしては適さない。また、ラベル化したコルヒチンなどを用いてチューブリン分子上での交換率から類縁体の活性を測定する方法や、コルヒチン-BSA 抗原により抗体を産出しラジオイムノアッセイ法によりコルヒチン類縁体の活性を判定することもできる。しかし、対象となる化合物は、その類縁体に限られるため一般的なスクリーニング法ではない。

14. レゾルシノール類縁体の有糸分裂阻害活性^(23,24)

前述のアッセイ法を用いて広く土壌由来の微生物代謝産物を検索し、*Pseudomonas* sp. 218 株の振盪培養液中にきわめて強い紡錘体形成阻害活性を認めた。培養液 1 μ l/ml 海水で処理すると第1分裂は完全に停止し、既存の紡錘体毒は認められないきわめて特異的な形状(タル型)の紡錘体が誘起される(図9)。各種クロマトグラフィーにより精製し、3種(T-1(21), T-2(22), T-3(23))

の活性成分を明らかにした⁽²⁵⁾。これらの化合物は強い活性を示し、なかでも T-1 (21) はコルヒチンの 50 倍から 100 倍 ($\sim 10^{-7}$ M) の活性を示した。また、T-1 は 5 位の側鎖の長さが異なる T-3 と大きく活性が異なるため、活性発現に最も適した側鎖の長さを類縁体の合成により検討した。その結果、 $R_1 = n-C_5H_{11}$, $R_2 = n-C_3H_7$ が最も活性が強く、0.05 μ g/ml で第1分裂を阻止することが明らかとなった⁽²⁶⁾。また、T-1, 2, 3 はそれぞれ長期培養により TO-1(24), TO-2(25), TO-3(26) に変換できるこ

とを重水素化した T-1, 2, 3 を用いて明らかにした⁽²¹⁾。TO-1 には顕著なタル型誘導効果は認められないが、微小管の過配向を誘起する新しい活性が認められた。

また T-1 と同様タル型紡錘体を誘起し、効果的に細胞分裂を停止させる活性物質の検索を試み *Penicillium* の 1 菌株に小型紡錘体誘導活性を見出した⁽²⁷⁾。活性物質 curvularin (27) は *in vitro* 系でのチューブリン重合を

図9 Taxol, T-1, macbecin I の特異紡錘体誘導活性

A, 対照区 [中期紡錘体]; B, taxol [10^{-5} M] 処理, 処理点 [受精後 25 分]; C, T-1 [10^{-7} M] 処理, 処理点 [受精後 35 分]; D, macbecin I [5×10^{-5} M] 処理, 処理点 [受精後 35 分]。

阻止する。しかし、分裂阻害有効濃度は T-1 に比して 100 倍程度高い。そこで T-1 における活性発現のための必須構造単位を考慮し約 30 種の誘導体を得、活性を検討した⁽²⁷⁾。その結果 3'-OCH₃、10-deoxo 体に T-1 に匹敵する著しい活性増大を認めた。また dehydro 体(28)は、小型のタル型紡錘体を誘起し、27 と同様 *in vitro* 系でのチューブリン重合を阻害する。小型紡錘体の誘導は、*in vivo* 系での微小管の配向が制約され、同時に微小管重合中心が分散するためと結論した。このように C-8 位近傍における微小な構造変化が *in vivo* におけるチューブリン重合、紡錘体の伸長に大きく寄与するのは大変興味を持たれる。

15. T-1 および curvularin の作用部位

タル型紡錘体は、いかにして生起するかは大変興味を持たれる。T-1 処理では中心体から細胞の外周に伸長する星糸微小管は、ほぼ完全に阻止される。しかし、両極間に存在する微小管量は、ほとんど減少していない。星糸微小管を欠いた T-1 処理胚では、染色体は赤道面に残り、4n の染色体を含む円の大きな核が生じる。またアカウニ胚では、O-diacetyl T-1 処理によって、しばしば複数のやせた紡錘体が生じる。すなわちチューブリン分子の重合核となる微小管重合中心 [MTOCs] に作用して、紡錘体のカナメの部分分散させタル型化すると考えられる。curvularin (27) およびきわめて活性の強い (10⁻⁷ M でタル型誘導効果を持つ) 3'-O-methylcurvularin にも T-1 と類似の効果が認められる。中心小体を取り巻く MTOCs については、不明な点が多い。これらの化合物は、MTOCs の性状解析のための生化学的試薬として、またアフィニティーカラム作製の材料として期待される。

16. TO-1, macbecin I, K-2 の特異活性^(28,29)

TO-1 (24) 処理によって誘起される紡錘体の形状は、ほぼ対照区と変わらないが複屈折量から算出される微小管は、数パーセント高い。この特異性発現のための必須構造単位としてベンゾキノンと適当の長さの疎水鎖の重

要性が指摘された。そこで疎水性側鎖を有するベンゾキノン類に注目し、ウニ胚をアッセイ系とし種々検討した。その結果、抗癌活性を有する macbecin I (29, Mac I) に予想を凌ぐ特異活性を見出すことができた(図9)。誘起される紡錘体の微小管量は通常の2倍に達し著しい過配向現象がみられ Mac I 処理により重合可能なチューブリン量が増加したものと考えられた。しかし、Mac I は、*in vitro* 系でのチューブリン重合に影響を示さない。TO-1 や Mac I に代表される微小管の過配向現象は、*in vivo* における微小管重合を取り巻く環境の複雑さを示すものである。また、中期分裂停止効果を示す K-2 (30) は濃度域により、呼吸、蛋白合成、紡錘体形成阻害など多様な活性を示す。これら化合物の作用機作の解明は、新しい効果的な細胞分裂抑制剤の開発の一助になると思われる。また、紡錘体形成に影響を持つ化合物群の植物細胞に対する阻害効果は、染色体工学の分野での利用の面からも大変興味を持たれる。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました岡山大学農学部河津一儀教授、京都大学農学部小清水弘一教授に深謝いたします。また、偏光顕微鏡解析に関し懇切なご指導、ご助言をいただきました名古屋大学理学部佐藤英美教授、伊藤知彦博士に厚く御礼を申し上げます。さらに、微生物の分離・培養等多々ご協力下さった京都大学農学部農業分析学研究室および岡山大学農学部生物資源化学研究室の方々に厚く感謝の意を表します。

(1) W. A. Remers (ed.): "The Chemistry of An-

- titumor Antibiotics," Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- (2) 小林昭雄, 川上智子, 廣田満, 小清水弘一: 日本農芸化学会昭和 54 年度大会講演要旨集, 1979, p.344.
- (3) 小林昭雄: 化学と生物, **23**, 162 (1985).
- (4) S. Ikegami and H. Nagano: *Nature*, **275**, 458 (1978).
- (5) S. Ikegami, K. Kawada, Y. Kimura and A. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 161 (1979).
- (7) A. Kobayashi, A. Takemura, K. Koshimizu, H. Nagano and K. Kawazu: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 585 (1982).
- (8) A. Kobayashi, A. Takemura, K. Koshimizu and K. Kawazu: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 867 (1984).
- (9) M. Tomasz, C. M. Mercado, J. Olson and N. Chatterjee: *Biochemistry*, **13**, 4878 (1974).
- (10) J. W. Lown, A. Begleiter, D. Johnson and A. R. Morgan: *Can. J. Biochem.*, **54**, 110 (1976).
- (11) P. Valenzuela, M. Quiroga, J. Zaldival, W. J. Rutter, M. W. Kirschner and D. W. Cleveland: *Nature*, **289**, 650 (1981).
- (12) E. Kraus, M. Little, T. Kempf, R. Hofer-Warbinek, W. Ade and H. Ponstingl.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **78**, 4156 (1981).
- (13) H. Mohri: *Nature*, **217**, 1053 (1968).
- (14) R. C. Weisenberg, G. G. Borisy and E. W. Tayler: *Biochemistry*, **7**, 4466 (1968).
- (15) T. A. Pfeffer, C. F. Asnes and L. Wilson: *J. Cell Biol.*, **70**, 281 (1976).
- (16) J. Bryan: *Exp. Cell Res.*, **66**, 129 (1971).
- (17) J. L. Hartwell and A. W. Schrecker: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2909 (1951).
- (18) S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, C. J. Gilmore, R. C. Haltiwanger and R. F. Bryan: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1354 (1972).
- (19) E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugio and M. Yoneda: *Nature*, **270**, 721 (1977).
- (20) S. M. Kapchan, A. T. Sneden, A. R. Branfman, G. A. Howie, L. I. Rebhum, W. E. McIvor, R. W. Wang and T. C. Schnaitman: *J. Med. Chem.*, **21**, 31 (1978).
- (21) S. Remillard, L. I. Rebhum, G. A. Howie and S. M. Kupchan: *Science*, **189**, 1002 (1975).
- (22) M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall and P. Coggon and A. T. McPhail: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325 (1971).
- (23) 小林昭雄, 他: 昭和 57~60 年度日本農芸化学会大会講演要旨集.
- (24) 小林昭雄: 日本農芸化学会・関東支部シンポジウム要旨集, 1983, p.12.
- (25) 小林昭雄: 日本放線菌研究会会報, No. 45, 4 (1984).
- (26) 小林昭雄: 「新しい生物活性物質の分子設計」, ソフトサイエンス社, 1986, p.153.
- (27) 小林昭雄, 日野知和, 宇根山健治, 河津一儀: 天然物化合物討論会要旨集, 1985, p.343.
- (28) H. Sato, A. Kobayashi, and T. J. Itoh: "Cell Motility," University of Tokyo Press, Tokyo, 1985, p. 357.
- (29) T. J. Itoh, H. Sato and A. Kobayashi: *Zool. Sci.*, **3**, 255 (1986).