微生物由来の特異的阻害剤による細胞周期の阻害と脱制御†

(1991 年度農芸化学奨励賞受賞)

吉 田 稔

(東京大学農学部農芸化学科)

自己増殖は生命現象の根幹をなすものであり、その過程は一見、連続的であるが、そこでは遺伝情報の源としての DNA の複製と分配という 2 つのステップが順序正しく行われている。細胞周期とは DNA 合成期 (S 期) と分裂期 (M 期)、およびそれぞれの準備期である G 1 期と G 2 期からなる一連の増殖プロセスのことであり、その制御は自己増殖の制御そのものにほかならない。

近年、癌の生物学は急速な進歩を遂げ、さまざまな癌遺伝子の正体が明らかになってくると、その多くは外部環境を感知して細胞増殖のシグナルを細胞内に伝えるシグナル伝達に関するものやそれを受けて増殖を指令する遺伝子発現制御因子であり、いずれも細胞周期の調節を担うものであることがわかってきた。すなわち細胞レベルでの癌の病因が細胞周期の調節異常であるとするれば、その調節機構をターゲットとする薬剤のなかに、選択的な制癌剤があると考えてよさそうである。そこで筆者らは細胞周期の調節が行われている G 1, G 2 期に照準を定め、新しい薬剤開発を開始した。その過程で得られたいくつかの薬剤は、G 1, G 2 期の進行を止めるだけでなく、M 期を経ずに S 期を繰り返して細胞を倍数化した、DNA 複製の途中で分裂を誘起するなど、細胞周期の可塑性ともいえる実にさまざまな脱制御現象を引き起こすことが明らかになってきた^{1)~4)}。ここではこうした特異的阻害剤の細胞周期研究における道具としての有効性と未来の化学療法への可能性を考察したい。

1. 細胞周期研究の戦略と阻害剤

細胞周期という概念は、細胞分裂期 (mitosis : M 期)

† Uncoupling of Cell Cycle Control by Specific Inhibitors from Microbial Origin.

Minoru YOSHIDA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University, Tokyo 113)

と次の分裂期との間に横たわる間期 (interphase) と呼ばれている長い時期のなかに、明確に隔絶された DNA 合成期 (S 期) が存在することを発見した 1951 年の Howard と Pelc の研究⁵⁾にまでさかのぼることができる。以来、S 期と M 期との間にはさまれた新たな間隙期 (gap phase) は、それぞれ G 1 期と G 2 期と呼ばれるようになったのである。細胞が増殖し、子孫細胞へ正しい遺伝情報を伝えるためには、DNA 複製とその分配が正確に行われなければならない。そこでそれらの準備期ともいえる G 1, G 2 期では、それらに誤りがないかどうかをチェックしたり、外界との環境に応じて次の過程に進行してよいかどうかの判断が行われているものと推定される。これら細胞周期の調節に物質的な因子が関与する可能性は、1970 年の有名な Rao らの細胞融合実験^{6,7)}によって明確に示された。彼らはまず M 期の細胞と他の期の細胞との融合実験から、M 期細胞の特徴である染色体凝縮 (これをとくに未成熟染色体凝縮と呼ぶ) と核膜の崩壊を引き起こす強力な (1) “M 期促進因子” が存在することを示した。また、S 期細胞と G 1 期細胞の融合を行うと、G 1 期細胞はただちに DNA 合成を開始することから、S 期細胞中には (2) “S 期活性化因子” が存在することも示唆された。一方、S 期細胞と G 2 期細胞との融合では、G 2 期の核は決して DNA 合成を始めたりはせず、むしろ自身が M 期へ進行するのを遅らせ、S 期の核の DNA 複製終了まで分裂をしないで待っていた。このことからすでに 1 回 DNA 複製を終了した G 2 期には、再複製をして DNA 量が増えたりしないような機構としての (3) “DNA 再複製ブロック” と複製完了など分裂の準備が整うまでは分裂を抑制する (4) “M 期遅滞因子” の存在が示唆されたのである。これら 4 つの制御メカニズムは、S 期と M 期の開始を制御するだけでなく、1 回の細胞周期のなかで S 期が繰り返されたり、M 期が 2 回起こったりしないように両者を互

いに共役させ、バランスのとれた増殖を行うための根幹となる調節機構であると考えられる。

ここ 2, 3 年の細胞周期研究の進展は目を見張るものがあった。その最大のトピックは、Masui と Markert⁽⁸⁾ により発見された減数分裂の成熟促進因子 (MPF: maturation-promoting factor) が、分裂酵母の G1, G2 期に機能する細胞周期制御遺伝子 *cdc 2*⁽⁹⁾ 産物とサイクリンと呼ばれる細胞周期に依存して消長するタンパク質⁽¹⁰⁾との複合体であり、M期特異的なヒストン H1 キナーゼ活性を有するユニバーサルなM期促進因子 (MPF: M phase-promoting factor) であることが明らかになったことである⁽¹¹⁾。卵を材料に主として生化学的手法で行われてきた MPF 研究と H1 キナーゼ研究の流れが酵母の分子遺伝学と合流して劇的な展開がもたらされたわけである。

しかし、ひるがえって考えてみると、これは前述の 4 つの基本的制御のうち 1 つにおいてようやく光があたり始めただけであり、他の 3 つは未だ闇に包まれた状態であって細胞周期の全体像の理解にはほど遠いのが現状である。

卵などを用いた生化学的アプローチと並んで細胞周期の解析における最も重要な戦略の 1 つは *cdc* (cell division cycle) 変異株⁽¹²⁾と呼ばれる一連の温度感受性変異株を用いた分子遺伝学のアプローチである。細胞周期制御の中心的役割を持つ *cdc 2* 遺伝子の研究をはじめとす

る酵母での解析が大きな成果となり、最近では哺乳動物培養細胞にもこの手法が応用されている^(13,14)。温度感受性変異株を特異的な阻害剤に置き換え、阻害剤の作用機構や耐性、感受性変異株からのアプローチも同様に重要な戦略として期待されるが、現実にはそのような特異的な阻害剤の開発が立ち遅れているため、十分に行われてはいない。そこで筆者らは細胞周期研究における特異的な阻害剤の利用とその制癌剤への応用を目指し、増殖の基本的制御を担っている時期と考えられている G1 期と G2 期の阻害剤に焦点を当てた。

2. トリコスタチンとレプトマイシンによる G1, G2 期停止と DNA 再複製の誘導

トリコスタチン A (TSA) および C^(15,16) は、かつて *Trichophyton* など限られたカビにのみ作用する物質として報告のあった物質であるが(図 1)、われわれはこれをフレンド白血病細胞の強力な分化誘導物質として再発見した^(17,18)。本物質は各種動物培養細胞に対して一次的な高分子合成阻害作用を示さずに増殖抑制作用を示すことから、われわれはまず、そのメカニズムを明らかにするため、安定な 2 倍体であり、接触阻止、高い血清要求性など正常細胞の増殖の典型を示すラット胚由来の繊維芽細胞 3Y1⁽¹⁹⁾ を用いていくつかの実験を行った。

この 3Y1 細胞に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の TSA を添加すると、その増殖は 24 時間以内に完全に停止し、薬剤を除くと

図 1 トリコスタチン、レプトマイシン、スタウロスポリンとそれらの各種類縁体の化学構造

長いラグを伴って一斉に再開する。このことは細胞周期のある特定の点で増殖が停止することを示唆する。そこでさらに、血清飢餓による G0 期同調培養とヒドロキ尿素による S 期同調培養を用いて TSA の作用を詳しく解析した。血清飢餓状態の細胞に血清を添加することによって始まる G0 期同調培養の各時間に TSA を加えると、血清添加後 6 時間以内に加えた細胞では S 期への進行がまったく見られず、TSA が G1 初期に作用することが明らかとなった。次にヒドロキ尿素により S 期に集められた細胞からヒドロキ尿素を除去することによって始まる S 期同調培養に TSA を添加すると、細胞当たりの DNA 含量が 2C から 4C へ移行する過程 (S 期) にはまったく影響をおよぼさず、4C から 2C への過程 (G2/M から G1) を完全に阻害することがわかった。詳しい解析によりこの 4C での停止状態は G2 初期であることが明らかとなっている。したがって正常繊維芽細胞の細胞周期においては、TSA の阻害点が G1 と G2 の 2カ所に存在することになる。これが G1, G2 期に特異的な阻害剤の実質的に初めての発見であった⁽²⁰⁾。

さらにその細胞周期停止作用の可逆性を調べるためにそれら停止細胞から TSA を除去し、その後の増殖をフローサイトメトリーで解析すると、G1 停止細胞も G2 停止細胞も共に、G0 期同調培養の場合と同じ長いラグを伴いながら S 期へ進行した。その結果、G2 停止細胞は新たな S 期 DNA 合成を経て 4C~8C のサイクルをまわる増殖性 4 倍体細胞へほとんど定量的に変換されたのである (図 2)。このことは、TSA によって G2 期で増殖を停止した細胞は短時間で M 期へ進行する能力を失い、本来 M 期を経ないと起こりえない DNA 再複製の抑制の解除が起こり、G2 期の DNA 含量のまま生理的

図 2 TSA による G1 停止と G2 停止の可逆性と 4 倍体細胞の出現

TSA 24 時間処理によって得られた G1 停止細胞と G2 停止細胞のおのおのから TSA を除き、その後の細胞当たりの DNA 含量を測定した。A: G1 停止細胞, B: G2 停止細胞。

には G1 期の細胞になることを示している。このような TSA による停止状態は、*c-fos* 遺伝子の発現などからむしろ G0 期の状態にきわめて近いものであると考えられ、図 3 のような G2→G0→G1 という従来まったく知られていなかった経路により倍数化することが強く示唆された⁽²⁰⁾。

一方、レプトマイシン B (LMB) は、分裂酵母と数種のカビにのみ特徴的な形態異常を誘起する抗真菌抗生物質として筆者らの研究室で単離、構造決定された新規化合物^(21,22)であるが (図 1)、最近、本物質も正常繊維芽細胞 3Y1 の増殖を G1, G2 両期で可逆的に停止させることが明らかとなった。S 期同調培養に添加した場合に起こる G2 停止の頻度は、ほとんど 100% に近い TSA に比べてやや低い、TSA の場合と同様に G2→G0→G1 という移行が認められ増殖性 4 倍体細胞が出現した (図 3)⁽²³⁾。以上の結果は細胞を殺すことなく G2 停止を引き起こす薬剤のなかに効率よく G2 期細胞の DNA 再複製ブロックを解除できるものがあることを示している。

3. トリコスタチン、レプトマイシンの標的分子

図 1 に示すように TSA には 6 位に不斉炭素があり、R, S の立体異性体が存在する。最近、Mori らにより、TSA の立体選択的な化学合成が成功し、天然型 TSA は R 体であると決定された⁽²⁴⁾。そこで筆者らは化学合成された TSA の両異性体についてフレンド細胞の分化誘導活性と G1, G2 特異的増殖阻害活性を調べたところ、非天然型である (S)-TSA には活性が認められず、

図 3 TSA, LMB の作用点と細胞周期上での進行経路
細胞周期の各期の DNA 含量を小円中に示した。A: TSA と LMB の阻害点とその後の G0 期への移行を示す。B: 薬剤除去後は 2n, 4n 双方の DNA 含量を持った G0 期細胞がともに G1 期から増殖を再開し、G2 停止細胞から増殖性 4 倍体細胞が形成される。

(R)-TSA とのみ相互作用する特異的な標的分子の存在が示唆された⁽²⁵⁾。この標的分子は細胞分化と G 1, G 2 期での増殖制御の双方に重要な役割を果たしていると考えられ、*cdc 2* 遺伝子制御系や遺伝子発現の制御系との関連が予想された。そこでリン酸化をはじめとするヒストンの修飾におよぼす作用を解析したところ、低濃度でヒストンのアセチル化が高度に誘導されることがわかり、これをきっかけとして以下に述べるように一気にその標的分子が明らかとなった⁽²⁶⁾。

ヒストンのアセチル化はクロマチン構造の変化を通じて転写、複製、分化等の高次の制御を担っていると考えられており、そのレベルはアセチル化酵素であるアセチルトランスフェラーゼと脱アセチル化酵素であるデアセチラーゼによって調節されている⁽²⁷⁾。TSA による高度なアセチル化の誘導がアセチル化酵素の活性化なのか、脱アセチル化酵素の阻害なのかを検討するため、³H-酢酸によるパルスチェイス実験を行った。その結果、本来速やかに消失するアセチル基が TSA の存在下ではまったく減少せず、ヒストンの脱アセチルの阻害が起こっていることが明らかとなった。そこで FM 3 A 細胞から部分精製したヒストンデアセチラーゼを用いて検討したところ、TSA は典型的な非拮抗型の阻害を示し、その K_i 値は 3.4 nM と決定された。この結果は、これまで唯一、mM オーダーの高濃度で界面活性剤様に本酵素を阻害すると報告されていた酪酸ナトリウム⁽²⁸⁾に比べ桁はずれに低い濃度で有効であることから、TSA が本酵素に対する実質的に初めての特異的阻害剤であることを示している。また、生物学的に不活性であった (S)-TSA やトリコスタチン酸には本酵素の阻害活性がなかったことから、この酵素の阻害が TSA の一次作用点である可能性が高くなった。これを完全に証明するためには、TSA 耐性変異株を取得し、その細胞中のヒストンデアセチラーゼの酵素活性が TSA に耐性となっているかどうかを調べればよい。そこで新たに FM 3 A 由来の TSA 耐性変異株の取得を試みたところ、10 倍以上の耐性を示し、他の薬剤との交叉耐性を示さない株 (TR 303) を得た。この変異株では TSA による *in vivo* でのヒストンアセチル化が 10 倍以上抑制されていただけでなく、部分精製した酵素の TSA に対する K_i 値が野生株の 9 倍に当たる 31 nM へと変化していた。以上の結果から TSA の標的分子はヒストンデアセチラーゼそのものであることが証明された⁽²⁶⁾。ヒストンの高アセチ

ル化はクロマチン構造の変化を引き起こし、その結果として遺伝子発現のパターンの変化、細胞周期の阻害や細胞分化などが起こるものと考えられるが⁽²⁹⁾、その詳細については今後の課題である (図 4)。

LMB についてはこのようなヒストン脱アセチル化への作用もなく現在まだその一次作用点は明らかでないが、分裂酵母の変異株を用いた解析から *cdc 2* 制御系にかかわるいくつかの変異株のみが LMB に対して異常感受性を示すことがわかり、その関連が強く示唆されている。さらに LMB 耐性を示す変異株から野生株分裂酵母に耐性を賦与する遺伝子をクローン化する試みが進行中であり、最近そのなかの 1 つが動物の多剤耐性遺伝子と相同なものであることが判明した⁽³⁰⁾。

いずれにせよ、作用機構の異なる薬剤による G 2 停止の間に G 0 (または G 1) 移行が起こりうるという事実

図 4 TSA によるヒストンデアセチラーゼの阻害とその生理作用

は、薬剤の直接の標的分子とのかかわりよりはむしろ、これら3つのギャップ期が生理的にはよく似た状態であり、少数の物質的な因子によりおのおのの性質が規定されていることを示唆する。たとえば、G2期の細胞にはG2期であることを記憶する何らかの因子が存在し、G2停止の間に分解される可能性が高い。最近、分裂酵母ではこの因子の実体が *cdc 2* 遺伝子産物自身であるらしいことが示された⁽³¹⁾。

4. 新しい検索法の確立とスタウロスポリン類の再発見

腫瘍細胞の分化誘導と真菌の形態異常というまったく異なるスクリーニングで得られた TSA と LMB が細胞周期においては同様の活性を有することは当初驚きであったが、細胞を殺すことを第1目的としない検索法はこれまで見逃されていた G1, G2 期の阻害剤を探すための方法としては有効であったと思われる。筆者らはこれらの阻害剤をより直接的に探索するために S 期に同調した正常繊維芽細胞 (3Y1) に対する薬剤の効果をフローサイトメトリーで測定するという系を考案した。この方法で放線菌の1種から得られたある物質は、低濃度 (0.001~0.01 $\mu\text{g/ml}$) で G1 停止、高濃度 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) で G2 停止を引き起こす。単離、構造解析の結果、最近強力なプロテインキナーゼ (とくに C-キナーゼ) の阻害剤であることが明らかとなっているスタウロスポリン⁽³²⁾であることがわかった (図1)。G0期からの同調培養を用いた詳しい解析の結果、スタウロスポリンによる

G1 停止は血清添加後2~3時間という G0/G1 の移行の時期にあり、G1 の中期、後期には作用しなかった。また、G2 停止の解除を行うと、TSA や LMB とは対照的に速やかに M 期へ進行し、きわめて同調率の高い G2 期同調培養が可能となった⁽³³⁾。

5. プロテインキナーゼ阻害剤による連続的な DNA 再複製と未成熟分裂の誘導

筆者らは以上のようなスタウロスポリンの細胞周期への作用に強い関心を持ったので、さらにインドロカルバゾール骨格を持つ他のプロテインキナーゼ阻害剤である K-252a⁽³⁴⁾, RK-286C⁽³⁵⁾ (図1) についても調べてみた。その結果、これらの阻害剤がスタウロスポリンと異なり、G1 停止作用を持たず、G2 停止作用だけを示すことがわかった。さらに予想外だったのは、この G2 停止の間に再び S 期へ進行して DNA 合成を行い、自動的な倍数化を引き起こしたことである。このような倍数化は調べたかぎりすべての細胞で観察され、細胞によっては 48 時間以内に 16~32 倍体に至る巨大核細胞へと変換された (図5)。このことはこれら阻害剤による G2 停止の間に G2→G1→S という M 期を経ない不完全な細胞周期が連続的に誘導されたことを示している⁽³⁶⁾。それでは逆に S 期を経ずに分裂が始まるようなことも起こりうるだろうか? ヒドロキシン尿素により S 期初期に停止させた細胞にスタウロスポリンや K-252a を加えてみると、数時間以内に細胞形態のラウンディングと染色体の凝縮が観察された。これは DNA 複製が終了してい

図5 K-252a 処理による巨大核細胞の出現

RSV でトランスフォームした 3Y1 細胞に K-252a を加えると 48 時間以内に 16~32 倍体の DNA 含量を有する細胞が出現してくる。このような多倍体は生育能力を失っている。

A: 対照 (2 倍体), B: K-252a 処理細胞 (多倍体), C: A の細胞 (矢印) を B の培養に混合した。

ないにもかかわらず、細胞がM期へ進行してしまったことを示している⁽⁹⁷⁾。このようなS期とM期の脱共役は、ある種の変異⁽⁹⁸⁾やカフェイン⁽⁹⁹⁾によっても起こることが知られているが、筆者らの結果はM期遅滞因子と細胞周期の共役機構にプロテインキナーゼが関与することを明確に示したものである。

以上の結果は、細胞周期においてS期とM期は独立した制御を受けており、両者の共役には何らかのプロテインキナーゼが必要であることを示唆している。いいかえれば、S期とM期はそれぞれ固有の“時計”で動いており、それらは“タイムキーパー”としてのプロテインキナーゼによって時間合わせが行われていると考えることができるのである(図6)。

お わ り に

これまで細胞周期は $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$ という順序で進行すると固く信じられてきたが、TSA, LMB による $G2 \rightarrow G0$ の誘導による倍数化、スタウロスポリンによるDNA複製を伴わないM期の誘導、K-252a, RK-286Cによる連続的なDNA再複製の誘導など、 $G1$, $G2$ に特異的な阻害を用いることによって細胞周期は驚くほ

Protein kinase as a “Time Keeper” ?

図6 細胞分裂(M)周期とDNA複製(S)周期のプロテインキナーゼによる共役
PKはプロテインキナーゼを示す。

ど可塑性に富んでいることが初めて明らかになった。ここで紹介した各種阻害剤の作用は、主として正常繊維芽細胞3Y1を用いて得られた結果であるが、他の多くのトランスフォーム細胞では必ずしも同じ結果は得られない。たとえばTSAは3Y1に対し静的に作用する一方、そのウイルストランスフォーム細胞には新たな蛋白質合成に依存して致死作用を示すが、このとき異常な染色体凝縮が起こっていることがわかってきた。こうした事実は、細胞の癌化に伴い、細胞周期の共役機構も大きく変化した可能性を示唆している。このような細胞周期の脱共役は細胞にとって致命的であることを考え合わせると、セルサイクルアンカッパーによる癌の化学療法という新しい概念が、実際に花開く可能性も十分考えられる。

一方、基礎研究試案としての細胞周期阻害剤を考えたとき、たとえばTSAを用いてヒストンデアセチラーゼの重要性が明らかとなったように、阻害剤の作用機構解析から細胞周期調節にかかわる新しいメンバーの発見、さらにはその耐性変異または超感受性変異等を用いた新たな遺伝子の取得といった進展が期待できるであろう。あるいはプロテインキナーゼ阻害剤による細胞周期の脱共役現象の発見は、これまで明確な変異株すら得られていないDNA再複製ブロックの機構に初めて解析の手がかりを与えたことになるであろう。地球上に生息する微生物の種とその代謝産物の著しい多様性を考えたとき、本来、生化学や分子遺伝学的アプローチと相補的であるべき微生物由来の低分子有機化学が、これまでの基礎生物学において十分には活用されていない感が否めない。微生物代謝産物中に新しい細胞周期阻害剤を求めるスクリーニングは、基礎と応用の両面で実り多い途の1つであると思われる。

本研究にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学農学部教授別府輝彦先生にあつく御礼申し上げます。本研究の一部は東京大学農学部教授森謙治先生、理化学研究所主任研究員磯野清博士、同副主任研究員長田裕之博士との共同研究であり、御指導、御協力下さいました先生方に深く感謝いたします。また、東京大学農学部助教授堀之内末治先生を始めとする東京大学醸酵学研究室の皆様の御助言、御協力に深く感謝いたします。

- (1) T. Beppu and M. Yoshida: in “Novel Microbial Products for Medicine and Agricul-

- ture," ed. by A. L. Demain, G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera and H. W. Rossmore, Elsevier, 1989, p. 73—78.
- (2) 吉田 稔, 別府輝彦: 蛋白質 核酸 酵素, **34**, 1069—1081 (1989).
- (3) 吉田 稔, 別府輝彦: ファルマシア, **27**, 440—445 (1991).
- (4) T. Beppu and M. Yoshida: in "Animal Cell Culture and Production of Biologicals," ed. by R. Sasaki and K. Ikura, Kluwer Academic Publishers, 1991, pp. 1—10.
- (5) A. Howard and S. R. Pelc: *Nature*, **167**, 599 (1951).
- (6) P. N. Rao and R. T. Johnson: *Nature*, **225**, 159—164 (1970).
- (7) R. T. Johnson and P. N. Rao: *Nature*, **226**, 717—722 (1970).
- (8) Y. Masui and C. Markert: *J. Exp. Zool.*, **177**, 129—146 (1971).
- (9) P. Nurse and Y. Bissett: *Nature*, **292**, 558—560 (1981).
- (10) T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt: *Cell*, **33**, 389—396 (1983).
- (11) P. Nurse: *Nature*, **344**, 503—508 (1990).
- (12) L. H. Hartwell, J. Culotti, J. R. Pringle and B. J. Reid: *Science*, **183**, 46—51 (1974).
- (13) T. Eki, T. Enomoto, A. Miyajima, H. Miyazawa, Y. Murakami, F. Hanaoka, M. Yamada and M. Ui: *J. Biol. Chem.*, **265**, 26—33 (1990).
- (14) 木村元喜: 細胞工学, 別冊 **4**, 81—90 (1988).
- (15) N. Tsuji, M. Kobayashi, K. Nagashima, Y. Wakisaka and K. Koizumi: *J. Antibiot.*, **29**, 1—6 (1976).
- (16) N. Tsuji and M. Kobayashi: *J. Antibiot.*, **31**, 939—944 (1978).
- (17) M. Yoshida, Y. Iwamoto, T. Uozumi and T. Beppu: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 563—565 (1985).
- (18) M. Yoshida, S. Nomura and T. Beppu: *Cancer Res.*, **47**, 3688—3691 (1987).
- (19) G. Kimura, A. Itagaki and J. Summers: *Int. J. Cancer*, **15**, 694—706 (1975).
- (20) M. Yoshida and T. Beppu: *Exp. Cell Res.*, **177**, 122—131 (1988).
- (21) T. Hamamoto, S. Gunji, H. Tsuji and T. Beppu: *J. Antibiot.*, **36**, 639—645 (1983).
- (22) T. Hamamoto, H. Seto and T. Beppu: *J. Antibiot.*, **36**, 646—650 (1983).
- (23) M. Yoshida, M. Nishikawa, K. Nishi, K. Abe, S. Horinouchi and T. Beppu: *Exp. Cell Res.*, **187**, 150—156 (1990).
- (24) K. Mori and K. Koseki: *Tetrahedron*, **44**, 6013—6020 (1988).
- (25) M. Yoshida, Y. Hoshikawa, K. Koseki, K. Mori and T. Beppu: *J. Antibiot.*, **43**, 1101—1106 (1990).
- (26) M. Yoshida, M. Kijima, M. Akita and T. Beppu: *J. Biol. Chem.*, **265**, 17174—17179 (1990).
- (27) B. M. Turner: *J. Cell Sci.*, **99**, 13—20 (1991).
- (28) L. S. Cousens, D. Gallwitz and B. M. Alberts: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1716—1723 (1979).
- (29) Y. Hoshikawa, M. Kijima, M. Yoshida and T. Beppu: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1491—1495 (1991).
- (30) K. Nishi, M. Yoshida, M. Nishimura, M. Nishikawa, M. Nishiyama, S. Horinouchi and T. Beppu: *Mol. Microbiol.*, **6**, in press (1992).
- (31) D. Broak, R. Bartlett, K. Crawford and P. Nurse: *Nature*, **349**, 388—393 (1991).
- (32) S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi and R. Masuma: *J. Antibiot.*, **30**, 275—282 (1977).
- (33) K. Abe, M. Yoshida, T. Usui, S. Horinouchi and T. Beppu: *Exp. Cell Res.*, **192**, 122—127 (1991).
- (34) H. Kase, K. Iwahashi and Y. Matsuda: *J. Antibiot.*, **39**, 1059—1065 (1986).
- (35) H. Osada, H. Takahashi, K. Tsunoda, H. Kusakabe and K. Isono: *J. Antibiot.*, **43**, 163—167 (1990).
- (36) T. Usui, M. Yoshida, K. Abe, H. Osada, K. Isono and T. Beppu: *J. Cell Biol.*, **115**, 1275—1282 (1991).
- (37) M. Yoshida, T. Usui, M. Kijima, Y. Hoshikawa and T. Beppu: 「投稿中」.
- (38) T. Nishimoto, E. Eilen and C. Basilico: *Cell*, **15**, 475—483 (1978).
- (39) R. Schlegel and A. B. Pardee: *Science*, **232**, 1264—1266 (1986).