

有用医薬資源を有する海洋生物の探索とその再生産過程のモニタリング

Studies on search for potential biomedical from marine organisms and on the estimation of the amount of reproduced marine organisms that contain biologically active substances

代表研究者	広島大学生物生産学部教授 Prof., Faculty of Applied Biological Sciences, Hiroshima Univ. Susumu IKEGAMI	池上 晋
協同研究者	東京大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Univ. of Tokyo Nobuhiro FUSETANI	伏谷 伸 宏
	北里大学水産学部教授 Prof., School of Fisheries Sciences, Kitasato Univ. Hisao KAMIYA	神谷 久 男
	広島大学生物圏科学研究科大学院生 〔現所属: 武田薬品工業(株)中央研究所〕 Grad. Student, Grad. School of Biosphere Sciences, Hiroshima Univ. Noboru TSUCHIMORI	土 森 登

In order to discover potential biomedical from marine organisms, it is important to adopt an assay method which is specific or selective to a particular activity as well as simple. We devised a starfish embryo assay system which is useful to discover potential antitumor drugs from marine organisms.

In the present study we re-evaluated the action of inhibitors of RNA synthesis on starfish embryos, and found that embryos of the starfish, *Asterina pectinifera*, synthesize RNA at very low rate during the cleavage stages and that only after blastulation, when mRNA synthesis commences, is the paternal contribution to the embryonic genome transcribed and expressed for the first time.

Shortly after blastulation, chromatin of embryonic cells is endowed with histone H1 and other proteins, and becomes functional; the machinery for synthesizing RNA gets under way.

Blastulation involves dynamic morphological movement of embryonic cells, in which blastomeres acquire the highly cooperative nature of epithelial cells. Agglutinins obtained from the skin mucus of the marine fish, *Genypterus caperensis* prevent blastulation of *Asterina pectinifera* embryos, suggesting a possible role of carbohydrate-containing components on the cell surface for an increasing adherence between the cells during blastulation.

Several substances that prevent mitotic cell divisions of fertilized *Asterina pectinifera* eggs were obtained from marine sponges. It is notable that all of them exhibited antitumor activity *in vitro*.

We also attempted to develop a method for estimating quantitatively the amount of reproduced marine organisms that contain biologically active substances. Eggs, embryos and larvae of *Asterina pectinifera* contain asterosaponins whose aglycones possessed antitumor activity *in vitro*. We prepared a monoclonal antibody from Balb/c mice immunized with a component obtained from the egg of *Asterina pectinifera*. The antibody prepared was shown to react selectively with eggs and embryos of *Asterina pectinifera*. The number of swimming embryos and larvae of this

species in the planktons collected off Sensui Island, Fukuyama City, was estimated by using the monoclonal antibody. It was found that the immunological assay is a useful way of detecting a single embryo or larva in the ocean.

研究目的

海洋生物は多彩な有機化合物を産生する。しかし、これらの化合物が医薬資源として利用された例は皆無に等しい。陸上生物資源の乏しい我が国は四方を海に囲まれており海洋生物が豊富である。我が国周辺海域に生息する海洋生物のなかに核酸合成阻害剤など、細胞機能に重要な影響をもたらす活性物質を見いだすことは、生命科学の発展に寄与するだけでなく、新規制がん剤の創成にも連なる重要な研究課題であると考えられる。これまでも国の内外で、海洋生物に由来する抗がん性成分の検索が進められた。しかし、広範な検索から得られた化合物は非特異的細胞毒性を示すものが多く、有用医薬品として開発が期待されるものは極めて少ない。それゆえ、非特異的細胞毒と阻害特異性の高い物質を簡便に分別し得るバイオアッセイ法の樹立が望まれる。

本研究ではイトマキヒトデ受精卵を用いて、この目的にかなう細胞検定法の確立を意図した。この検定法に準拠して、我が国南西海域に生息する多種類の海洋生物から動物細胞分裂阻害物質を得、これら細胞分裂阻害物質の制がん活性を評価し、有用性ががん剤の開発を意図することを第一の研究目的とした。

海洋生物の再生産は環境変化や乱獲によって容易に変動する。特定の生物が特定の海域において、どの程度の再生産が見込まれるかを予測する方法を樹立することは、海洋生態系のバランスを維持しつつ、合理的に海洋生物成分の開発を図る上で不可欠の研究課題であると考えられた。このために、特定生物のプランクトン期幼生量をモニタリングする新技術の開発を意図した。本研究では特異な薬理活性を有するイトマキヒトデをモデルとして、その初期発生過程において存在しつづける蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いて各海域で得たプランクトン

混在試料中の抗原蛋白質量を測定した。これによって特定海域におけるイトマキヒトデの発生予察が可能になると考えられた。この成果をもとに、特定生物の再生産量を予測する新技術の樹立を図ることを第二の研究目的とした。

研究経過および成果

1. イトマキヒトデ胚を指標とした細胞分裂阻害剤の開発

1.1 イトマキヒトデ胚による阻害剤検定法の確立

先に我々は、イトマキヒトデ受精卵を被験細胞として、選択的な細胞分裂阻害剤を、その作用機作に基づいて分別することを試みた。その概略は以下のとおりである。

イトマキヒトデの十分に発達した卵巣中の卵は卵核胞と呼ばれる大きな核があり(図1A)、これには4Nの染色体数に相当するDNAが含まれ、第一減数分裂前期の移動期に相当している。この卵は卵母細胞と呼ばれる。この卵母細胞に1-メチルアデニン(1-methyladenine, 以下1-MeAdeと略称する)を最終濃度が1 μ Mとなるように加えると、20 $^{\circ}$ Cにおいて約30分で卵核胞が崩壊し(図1B)、第一減数分裂中期に達する。60分後に極端に不均等な分裂が行われる。小さい方の細胞は第一極体と呼ばれる。大きい方の卵母細胞はさらに60分後に再び不等分裂し、第二極体を生ずる。この2回の分裂が減数分裂で、この間に染色体DNAは4等分され、卵内に最終的に半数性(N)のDNAが残る。第二極体放出後、約30分で雌性前核の形成が認められる。卵表層は1匹の精子を受け入れた後、他の精子貫入を防げる膜電位を生ずるが、この多精拒否機構がよく機能するのは卵核胞の崩壊から第一極体形成に至る約30分の間である。(図1C)。卵内に入った精子核は第二極体形成が行われた後(図1D)、雌性前核が形成される時点で膨大し雄性前後となり、その後、雌

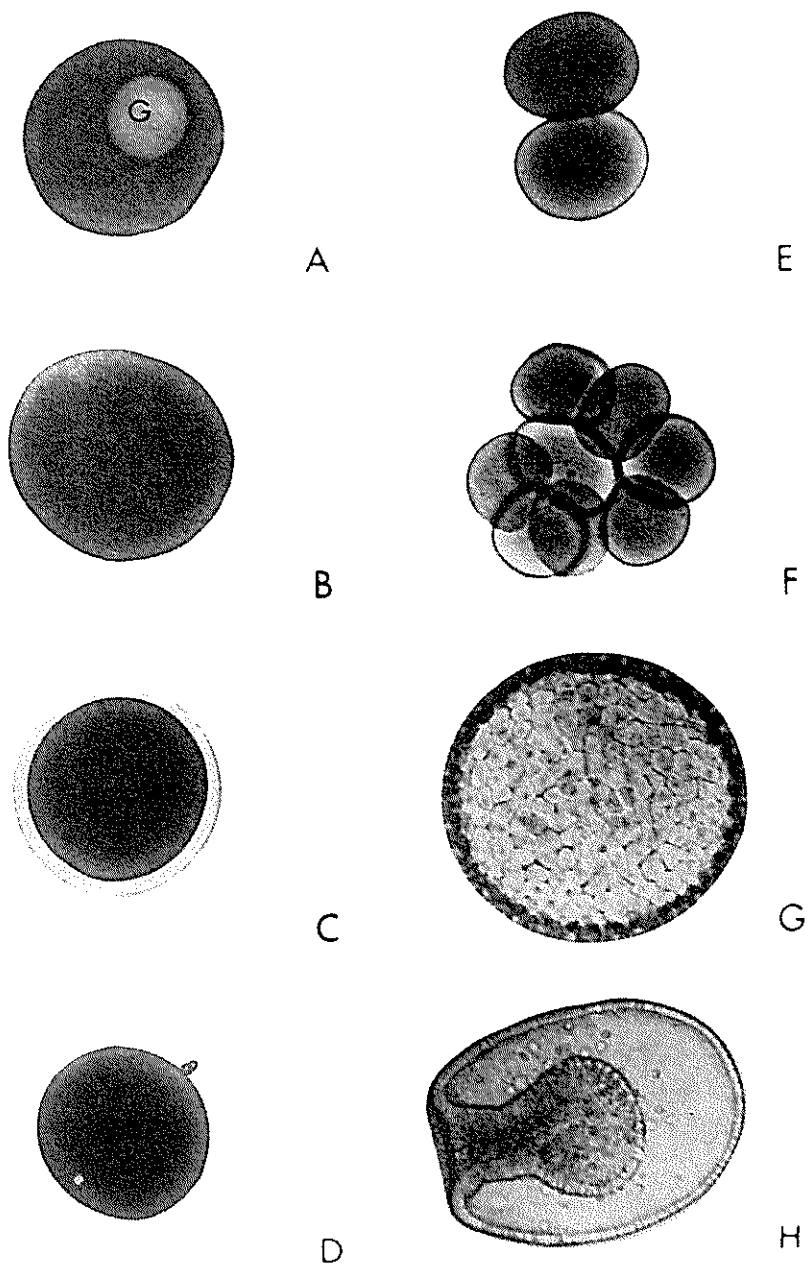


図1. イトマキヒトデの卵成熟と初期発生.

A, 卵母細胞 (G は卵核泡); B, 成熟卵; C, 受精卵; D, 極体放出; E, 細胞期胚; F, 8細胞期胚; G, 胞胚; H, 原腸胚.

表1. イトマキヒトデ卵成熟・胚発生過程を阻害する化合物の分別法

阻害される発生段階	阻 害 剤	相互分別法
卵核胞の崩壊	形質膜破壊剤 (アンフォテリシン B) 電子伝達系 (アンチマイシン A1, ビエリシジン A1) タンパク質合成阻害剤 (シクロヘキシミド, ビューロマイシン)	
第1極体の形成	微小管阻害剤 (ボドフィロトキシン, ビンフラステン, グリセオフルビン, アンサマイトシン, コルセミド) マイクロフィラメント阻害剤 (サイトカラシン D)	脱纖毛胚の纖毛再生阻止 多核胚細胞形成
胞胚形成	DNA 合成阻害剤 (アフイディコリン, アラビノシルシトシン, プレオマイシン A3) デオキシリボヌクレオチド合成阻害剤 (N-ヒドロキソウレア, メソトレキセート) RNA 合成阻害剤 (アクチノマイシン D) タンパク質糖鎖導入阻害剤 (ツニカマイシン)	無染色体分裂 デオキシリボヌクレオシドによる阻害回復
原腸胚形成		

性前核と合体して融合核となる。この核融合に先立って染色体 DNA の複製が行われる。したがって、融合核には 4N の染色体 DNA が存在することになる。この後、受精卵、すなわち胚は等しい 2 個の割球に分離し (図 1E), 引続き、胚は 30 分ごとに DNA の複製を伴う有糸分裂を繰り返し、桑実胚となる (図 1F)。受精後 5 時間 30 分、すなわち細胞の数が 256 となった時点で、胚は一層の細胞層でかこまれた中空の胞胚となり (図 1G)、受精後 10 時間で中期胞胚となる。中期胞胚から細胞周期に G1 期が出現し、胚細胞の分裂の同調性は失われる。さらに 1 時間後に個々の細胞表層に一本ずつ絨毛が生じ受精膜内で胚の回転が始まる。受精後 13 時間で受精膜が溶解し、遊泳を始め、受精後約 15 時間で原腸の形成が開始する (図 1H)。これらの多彩な細胞分化の過程で、特定の時期に発生を阻害する選択的阻害剤が存在する。これらの阻害剤が作用する時期は表 1 に示すとおりである。

本研究において、RNA 合成阻害がもたらす発生阻止機構について詳細な検討を加えた。

イトマキヒトデ胚の RNA 合成は、胞胚形成期に至って始めてその速度が高まる。この時期で生ずる新生 RNA 分子は密度勾配遠心場において 15 S の分画に回収される。従来から細胞レベルで RNA 合成を停止させる薬剤として繁用されたアクチノマイシン D を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加え

た海水中で飼育したイトマキヒトデ胚では、64~256 細胞期において RNA 合成速度は対照胚の約 30%であったが、胚は胞胚を形成することなく死に至った。アクチノマイシン D 処理胚をビスベンザミドで蛍光染色したところ、32 細胞期に選択的に核が崩壊し、以後無染色体分裂が繰り返されることが明らかになった。すなわち、RNA アクチノマイシン D によるイトマキヒトデ胚の発生停止は一義的に RNA 合成阻害作用によるものではなく、染色体複製不全によってもたらされる無核化に基づく結論される。細胞生理化学で手軽な RNA 合成阻止剤として利用されてきたアクチノマイシン D は、その選択性が劣っており、イトマキヒトデ胚 RNA 合成阻害に使用し得ないことが判明した。

池上らは放線菌 *Streptomyces albus* の培養液から、イトマキヒトデ胚の RNA 合成を選択的かつ可逆的に阻害する新 C-ヌクレオシドを得た。本化合物は 7-(β -ribofuranosyl)-4-oxo-3H, 5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine の構造を有することが判明した。本化合物が胚発生に及ぼす影響を調べた結果、RNA の新生は初期胞胚になって始めて必要になることが明らかとなった。さらに、類縁の既知 C-ヌクレオシド、ホルマイシンをイトマキヒトデ受精卵に与えてその効果を調べたところ、本化合物は胞胚形成期に賦活化される RNA 合成を選択的に阻害し、胚発生は細胞形成直後で停止

した。この RNA 合成阻害はピリミジン・ヌクレオシドの投与によって克服され、胚は正常に原腸胚期に至った。これらの結果から、イトマキヒトデの未受精卵中には mRNA が貯蔵されており、胞胚形成までに必要な蛋白質合成の鋳型として使われるが、胞胚形成以後の発生は RNA の新生に依存すること、このイトマキヒトデ胚は RNA 合成の選択的阻害剤を簡便かつ的確に検出する上で極めて有用であることが明らかとなった。

胞胚形成を境に、細胞質の機能が核機能と強く連関した発生進行の統御機構が出現する。この機構はどのような特性をもつてであろうか。

池上らは、枯草菌 *Bacillus subtilis* の培養液中に胚発生を 256 細胞期で停止させる活性が存在することを見だし、その本体の精製・単離を行った。その活性本体は、アデノシンに他ならなかった。イトマキヒトデ受精卵を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアデノシン存在下で連続的に飼育したところ、128 細胞期で卵割の遅れが生じ、256 細胞期で胞胚形成が行われた後、発生が停止した。卵割の遅れが始まる 128 細胞期での DNA 合成と RNA 合成の速度は対照胚と同一であり、核酸合成系がアデノシンの発生阻害の作用点ではあり得ない。

胚発生のさまざまな時点からアデノシン処理を開始して発生停止効果を調べたところ、発生停止が起こるのは胞胚形成直後の 256 細胞期から胞胚前期に限られており、胞胚期中期以後にアデノシン処理を開始しても胚発生に何の影響ももたらさなかった。逆に、受精直後にアデノシンを加え、一定時刻後に胚をアデノシンを含まない海水中に移しかえて飼育した。受精直後から 64 細胞期にアデノシン処理を施しても発生に影響は及ぼさなかった。注目すべきは、256 細胞期で発生を停止した胚から 10 時間後にアデノシンを除去しても発生は再開し、原腸胚期を経てピピンナリア幼生期に至った。すなわち、イトマキヒトデ胚は胞胚前期にアデノシンによって発生が可逆的に停止する特徴を有する。

受精直後から胚にアデノシンを与え、各時刻で蛋白質合成速度を調べたところ、発生の遅延が始まる 128 細胞期から合成速度が低下し、128 細胞

期では対照胚の 5% まで減少した。この時点で DNA 合成と RNA 合成は完全に停止した。アデノシンを除去すると蛋白質合成速度は徐々に回復し、10 時間後には対照胚と同じレベルに達した。DNA 合成と RNA 合成も徐々に回復し、この回数に合わせた発生が進行した。この可逆的発生停止は休眠と名付けられた。

胚の ATP, ADP, AMP, 3',5'-サイクリック AMP の含量はアデノシン処理で変化しないが、遊離アデノシン量は数倍増加した。外液のアデノシンを除去すると細胞内アデノシン量も減少する。細胞内アデノシン濃度の増減が直後、発生の進行を統御する可能性が考えられる。また、アデノシンを除去して休眠が破られた胚で最初に合成が高まる蛋白質の分子量を調べた結果、見かけの分子量が 29 キロダルトンのメチオニン含有クロマチン蛋白質の特徴的な合成が認められた。このクロマチン蛋白質が直後発生の進行に係わるかどうか今後検討を加えるべき課題である。

上に述べた結果から、受精卵のクロマチンは一般体細胞のそれに比べて構造的にも著しく異なることが判明した。受精卵中に存在する未熟なクロマチンが転写の機能をもつ成熟した構築物に組み上げられることが初期発生にとって極めて重要な過程であり、イトマキヒトデ胚では胞胚形成直後の時期が、クロマチン成熟の完成される時点に相当すると結論づけられる。

1.2 胞胚形成阻害性海洋生物レクチン

神谷らは、イトマキヒトデ胚発生を選択的、可逆的に胞胚期で停止させる蛋白質をキンググリップ (*Genypterus caperensis*) 粘液中に見出した。本蛋白質は、ほ乳類赤血球や腫瘍細胞を凝集させるレクチン活性を有していた。また本レクチンは T リンパ球を特異的に幼若化させる作用を有していた。さらにフィジー産ソフトコーラル *Sinularia* sp. からガラクトース結合性レクチン、sinularin を単離した。本レクチンは分子量 78 キロダルトンの糖蛋白質であり、その糖含有量は 11% であった。sinularin はバフンウニ胚の発生を胞胚期で停止させたが、処理胚を海水で洗浄すると正常発生が進行した。また、sinularin はマウス白血

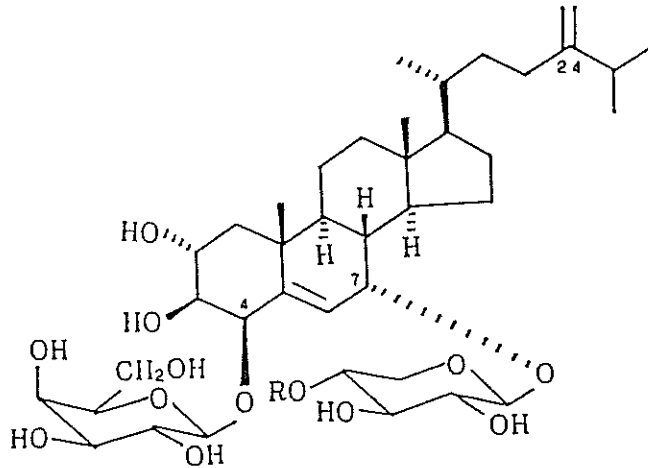


図2. Pachastrelloside A (R=CH₃CO).

病細胞 L-1210 や L5178Y 細胞を凝集した。

類似した卵割阻害作用をもつレクチンはマアナゴ (*Conger myriaster*) 粘液中からも分離された。マアナゴの D-ガラクトース結合特異的レクチンである congerin は複数成分からなるが、いずれも分子量 30 キロダルトで、サブユニットから構成されている蛋白質である。congerin はイトマキヒトデ胚に 64 細胞期から発生異常を引き起こし、胞胚期において細胞溶解をもたらし、胚を死滅させる活性を示した。この毒性はラクトースの添加によって可逆的に阻止された。

胞胚形成直前に胚細胞間の接着性が増大する。胞胚形成の重要な推進力は細胞膜を介した細胞間相互作用である。上述の海産動物レクチンは細胞表面の糖に結合することによってこの細胞間相互作用を特異的に阻止し、その結果、胚の発生停止をもたらすものと考えられる。

以上のとおり、キングクリップ・レクチンや sinularin は腫瘍細胞表面の糖構造を探索する上にも有用な、糖特異性の高いレクチンであることが見いだされた。

1.3 受精に伴う細胞膜変化と卵割阻害

池上らは、愛媛県釜木港産カイメン, *Pachastrella* sp. の抽出物がイトマキヒトデ卵成熟過程を阻害しないが、受精卵の卵割を阻害する活性を見いだした。卵割阻止受精卵の核分裂は対照胚とは

ほぼ同時刻におこり、核数を増加させてゆくが、対照胚が胞胚になる時点で多核単細胞胚内のクロマチンは崩壊した。各種クロマトグラフィー操作を経て本物質を精製、単離した。本物質は新規であり、その化学構造をステロイドに単糖二個が結合したサポニン、2 α , 3 β -dihydroxy-4 β -O-(4-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-7 α -O-(4-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl)ergosta-5, 24(28)-diene (図2)と決定した。本サポニンを pachastrelloside A と命名した。pachastrelloside A はマウスルイス肝ガン細胞 LL/2, ヒト白血病細胞 K562, ヒト乳ガン細胞 MGF-7 の増殖をそれぞれ 50, 25, 50 μ g/ml の濃度で完全に阻害した。イトマキヒトデ多核単細胞胚を形成させる最低有効濃度は 20 μ g/ml であった。しかし、50 μ g/ml の pachastrelloside A を卵母細胞に与え、2 時間後に 1-MeAde を加えたところ、対照卵母細胞と同様、卵成熟の全過程が進行した。精子の先体反応喚起と卵細胞膜への結合過程は阻害されなかったが、受精時の受精膜形成は阻害された。これらの結果から、イトマキヒトデ卵の細胞膜は受精を境として pachastrelloside A に対し感受性をもつようになる結論される。

1.4 卵割阻害物質

伏谷らは鹿児島県口永良部島で採集した海綿 *Acanthella klethra* からイソニトリル基を介する

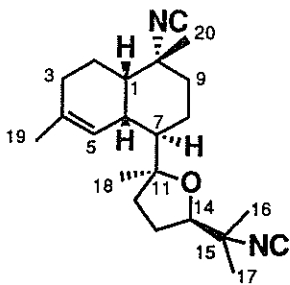


図 3. Kalihinene.

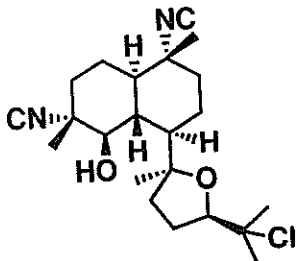


図 4. Isokalihinol B.

新規ジテルペン、カリヒネン (図 3) およびイソカリヒノール B (図 4) を単離した。カリヒネンは $50 \mu\text{g/ml}$ 、イソカリヒノール B は $25 \mu\text{g/ml}$ の濃度でイトマキヒトデ受精卵の第一卵割を遅延させた。対照胚が、1024 細胞期に至る受精後 9 時間 (21°C) の時点でも処理胚は 64 細胞期にとどまり、発生することなく死に至った。これらの類縁化合物カリヒノール A は $100 \mu\text{g/ml}$ で同様の卵割阻害を示す。この阻害の詳細を検討した結果、カリヒノール A は DNA ポリメラーゼ活性を阻害することによってクロマチン複製を伴いそのまま無染色体分裂を続けて、64 細胞期に至り発生を停止させることが判明した。DNA ポリメラーゼを阻害するテルペンは、カビが生産するジテルペン、アフィディコリンの他には知られておらず、極めて注目すべき化合物である。カリヒネンは P388 マウス白血病の増殖を IC_{50} $1.2 \mu\text{g/ml}$ で、イソカリヒノール B は IC_{50} $0.8 \mu\text{g/ml}$ で阻害した。

伏谷らはさらに、愛媛県日振島で採集した海綿 *Haliclona* sp. から抗カビ性を指標に精製し、2 種の新規アルカロイド、ハリクラミン A および B

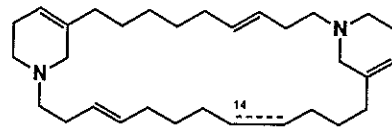


図 5. Haliclamines A and B (14 Δ).

(図 5) を単離した。2 個のテトラヒドロピリジン環をもつ特異な大環状構造のハリクラミン A, B はバフンウニ受精卵の卵割をそれぞれ 10 および $5 \mu\text{g/ml}$ で阻害した。また、P388 腫瘍細胞に対してハリクラミン A は IC_{50} 0.39, B は $0.75 \mu\text{g/ml}$ の増殖阻害活性を示した。

以上述べたとおり、海洋生物はイトマキヒトデ受精卵の胚発生を停止させるさまざまな化合物を産出する。これらの化合物の多くは腫瘍細胞の増殖を抑制する活性を示した。抗腫瘍活性を担う化学構造要素を把握し、新しい制ガン剤を創製する試みは、資源の乱獲、枯渇を招くことなく海洋生物の示す情報を活用する方途の一つとして、今後さらに推進するべきものと考えられる。

II. モノクロナール抗体を用いたイトマキヒトデの発生予察

イトマキヒトデは日本各地の海岸に広く分布し、養殖魚介類を食害する代表的な生物種である。一方、本種にはアステロサポニンと総称される多数のステロイド性サポニンが多量含まれており、これは医薬資源としても極めて注目される海産生理活性物質である。

イトマキヒトデは日本各地の海岸でその産卵期が異なっており、利尻島で 1 月、横須賀市で 5 月、松山市で 7 月、青森市で 9 月、福山市で 11 月に産卵する。しかし、その他の過半の海域における産卵・発生状況は不明である。

本研究では、イトマキヒトデ卵に存在する種特異的蛋白質を検索した。イトマキヒトデ初期発生期を通じて常に存在する種特異的蛋白質をマウスに免疫し、モノクロナール抗体を得、これを用いて特定海域からサンプリングしたプランクトン混在試料中の抗原蛋白質を検出し、定量することによって、その海域におけるイトマキヒトデ再生産量を予測する方法の開発を試みた。

イトマキヒトデ卵巣を 1-MeAde 処理すること

によって放出された成熟卵の抽出液を硫酸分画後、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーして得られた画分を Balb/c マウスに免疫し、脾細胞を得た。これをマウス・ミエローマ SP2 細胞と融合し、多数のハイブリドーマを調整した。いくつかのハイブリドーマ培養上清のうち、胚の 56 および 58 キロダルトンの分子量をもつ蛋白質に反応する抗体は、卵母細胞、受精卵、胞胚からピピンナリア幼生期にいたる発生過程に常に反応するものであった。ハイブリドーマのクローニングを繰り返し、56 および 58 キロダルトン蛋白質に特異的に反応するモノクローナル抗体 K1 を得た。KI はキヒトデ、バフンウニ、アカウニ、カシパンの卵に反応せず、イトマキヒトデ卵・胚に特異的に反応することが明らかになった。また、イトマキヒトデ属のヌノメイトマキヒトデおよびチビイトマキヒトデのブラキオラリア幼生は K1 に反応しなかった。しかし、コイトマキヒトデのブラキオラリア幼生は K1 に反応した。コイトマキヒトデ幼生中の抗原蛋白質の分子量はイトマキヒトデ卵・胚中の抗原とは異なり、41 キロダルトンであることが判明した。したがって、免疫ブロッティングによって、イトマキヒトデとコイトマキヒトデの分別が可能となる。免疫ブロッティングによるイトマキヒトデ卵の検出限界は 0.06 個分の卵であった。ELISA 法による検出限界は 0.01 個分の卵に相応した。コイトマキヒトデは母親の体腔内で受精・発生・変態し、稚ヒトデとなって体外に這い出すので、全生活史中にプランクトン期を経ることは無い。また本種の体長は数 mm、一個体が産出する卵数は数千個に満たない。したがって、K1 を用いて直接、プランクトン試料中に存在するイトマキヒトデ胚量を ELISA 法による定量を行っても、コイトマキヒトデ胚の混入による測定誤差が生じることはあり得ない。

以上の結果をもとに、海水中に浮遊するイトマキヒトデ胚の免疫学的定量を試みた。広島県福山市仙酔島彦の浦において 1987 年 11 月 22 日に、海底より 1 m の高さ、別の地点で海底より 3.5 m の高さで 100 μ m のメッシュをもつプランク

トン・ネットを水中に 50 m 引き、プランクトン試料を得た。これを抽出し、K1 を用いて ELISA 法によってイトマキヒトデ胚数を定量した。その結果、6 トンの海水中に 100~400 個のイトマキヒトデ幼生が浮遊しているものと算定された。この彦の浦で発達した卵巣をもつイトマキヒトデの数の割合は、1987 年 1 月 11 日に 1/190 (1 個体の雌のうち 1 個体が成熟卵巣をもつことを示す)、2 月 26 日に 63/1,449、7 月 9 日に 26/316、10 月 29 日に 70/720、11 月 15 日に 4/128、12 月 19 日には 5/300 であった。この結果は、イトマキヒトデが主として 11 月上旬に産卵したことを示している。免疫学的検出法の結果はこの推定を支持している。

これらの研究方法を用いて、イトマキヒトデの産卵状況が明らかでない海域において、イトマキヒトデの発生時期を予測することが可能となると考えられる。特定海域における特定生物種の発生時期をモニターする新しい方法として、種特異的モノクローナル抗体を利用した免疫学的定量法の導入は、海洋生物研究を大きく発展させる技術となるものと確信する。

謝 辞

本研究は、昭和 62 年から平成元年の 3 年間にわたる財団法人日産科学振興財団の研究助成によるものである。ここに同財団ならびに同研究助成選考委員の方々、本研究を推薦していただいた社団法人日本農芸化学会に深甚の謝意を表す。本研究で用いられた研究材料の多くは、広島大学生物生産学部練習船豊潮丸による研究航海中に採集したものをを用いた。同船船長福浦吉行助教授ならびに船員各位に深謝する。

研究発表

- 1) N. Tsuchimori, S. Miyashiro, H. Shibai and S. Ikegami: Isolation and identification of a specific and reversible inhibitor of starfish development. *FEBS Lett.*, **218**, 205-208 (1987).
- 2) S. Ikegami, S. Sasaki, T. Higaki, N. Itoh and N. Shinagawa: Coupled translation-transcription of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus infected into oocytes of the frog, *Xenopus laevis*. *J. Biochem.*, **103**, 19-23 (1988).
- 3) K. Hori, S. Ikegami, K. Miyazawa and K. Itoh:

- Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*. *Phytochemistry*, **27**, 2603-2607 (1988).
- 4) N. Tsuchimori, S. Miyashiro, H. Shibai and S. Ikegami: Adenosine Induces dormancy in starfish blastulae. *Development*, **103**, 345-351 (1988).
 - 5) N. Tsuchimori, S. Miyashiro, H. Shibai and S. Ikegami: Significance of an increase of an increase of intracellular adenosine concentration for dormancy in starfish blastulae. *Development. Growth Differ.*, **30**, 553-562 (1988).
 - 6) H. Isomura, N. Itoh and S. Ikegami: RNA Synthesis in starfish embryos: developmental consequences of its inhibition by formycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1007**, 343-349 (1989).
 - 7) H. Hirota, S. Takayama, S. Miyashiro, Y. Ozaki and S. Ikegami: Structure of a novel steroidal saponin, pachastrelloside A, obtained from a marine sponge of the genus *Pachastrella*. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3321-3324 (1990).
 - 8) S. Ikegami. Chromatin maturation during early development of the starfish, *Asterina pectinifera*. In *Advances in Invertebrate Reproduction*, Vol. 5, pp. 75-80, Elsevier, Amsterdam (1990).
 - 9) S. Ikegami, H. Isomura, N. Tsuchimori, Y. T. Osano, T. Hayase, T. Yugami, H. Ohkishi & T. Matsuzaki. Structure of pyrrolisine, a novel inhibitor of RNA synthesis, from the actinomycete *Streptomyces albus*. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 9668-9669 (1990).
 - 10) S. Ikegami, T. Mitsuno, M. Kataoka and M. Komatsu; Species specificity of a monoclonal antibody to polypeptides present in the eggs of the starfish, *Asterina pectinifera*. In *Echinoderms*, Vol. 4, A. A. Balkema, Rotterdam, in press.
 - 11) S. Ikegami: The starfish embryo assay useful for screening of new inhibitors of RNA synthesis. In *Topics in Industrial Microbiology: Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, Vol 2, Elsevier, Amsterdam, in press.
 - 12) S. Ikegami, Y. Ozaki, Y. Ooe and N. Itoh: Achromosomal cleavage of early starfish embryos cultured in the presence of actinomycin D. *Development. Growth Differ.*, in press.
 - 13) H. Kamiya, K. Muramoto and Goto: Isolation and characterization of agglutinins from the hemolymph of an acorn barnacle, *Megabalanus volcano*. *Develop. Comp. Immunol.*, **11**, 297-307 (1987).
 - 14) H. Kamiya, K. Muramoto and R. Goto: Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort), skin mucus. *Develop. Comp. Immunol.*, **12**, 309-318 (1988).
 - 15) R. Goto, K. Muramoto, M. Yamazaki and H. Kamiya: Purification and characterization of the soft coral, *Sinularia* sp. *Develop. Comp. Immunol.*, in press.
 - 16) N. Fusetani, K. Yasukawa, S. Matsunaga and K. Hashimoto: Dimorphosides A and B, novel steroid glycosides from the gorgonian *Anthoplexaura dimorpha*. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1187-1190 (1987).
 - 17) N. Fusetani, S. Sugano, S. Matsunaga, K. Hashimoto, H. Shikama, A. Ohta and H. Nagano: Isolation of a hexaprenylhydroquinone sulfate from the marine sponge *Dysidea* sp. as an H, K-ATPase inhibitor. *Experientia*, **43**, 1233-1234 (1987).
 - 18) Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, R. Sakai, T. Higa and Y. Kashman: Antitumor macrolides isolated from a marine sponge *Theonella* sp.: Structure revision of miosakinolide A. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6225-6228 (1987).
 - 19) N. Fusetani: Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In *Bioorganic Marine Chemistry*, Vol. 1, pp. 61-92, P. J. Scheuer ed., Springer-Verlag, Berlin (1987).
 - 20) Y. Kato M. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto and K. Koseki: Isolation and structure elucidation of calyculins B, C and D, novel antitumor metabolites, from the marine sponge *Discoderma calyx*. *J. Org. Chem.*, **53**, 3930-3932 (1988).
 - 21) N. Fusetani: Antifungal substances from marine organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **544**, 113-127 (1988).
 - 22) N. Fusetani, M. Asano, S. Matsunaga and K. Hashimoto: Acalycixeniolides, novel norditerpenes with allene functionality from two gorgonians of the genus *Acalycigorgia*. *Tetrahedron*, **45**, 1647-1652 (1989).
 - 23) N. Fusetani, K. Yasumuro, S. Matsunaga and K. Hashimoto: Mycalolides A-C, hybrid macrolides of ulupalides and halichandramide, from a sponge of the genus *Mycale*. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2809-2812 (1989).
 - 24) S. Matsunaga, N. Fusetani, K. Hashimoto and M. Walchli: Theonellamide F. A novel antifungal bicyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2582-2588 (1989).
 - 25) N. Fusetani, K. Yasumuro, S. Matsunaga and

- H. Hirota: Haliclamines A and B, cytotoxic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6891-6894 (1989).
- 26) N. Fusetani, K. Yasumuro, H. Kawai, T. Natori, L. Brinen and J. Clary: Kalihinene and isokalihinol B, cytotoxic diterpene isonitriles from the marine sponge *Acanthella klethra*. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3599-3602 (1990).
- 27) N. Fusetani, S. Matunaga, H. Matsumoto and Y. Takebayashi: Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, in press.