

1-ニトロベンジルアデニン位置異性体による ヒトデ卵成熟誘起作用の解析

三田雅敏 実吉峯郎*1 齋藤美帆*1 吉国通庸*2 長濱嘉孝*2

Analysis of Oocyte Maturation in Starfish Induced by 1-Nitrobenzyladenine Position-Isomers

M. MITA, M. SANEYOSHI*1, M. SAITO*1, M. YOSHIKUNI*2 and Y. NAGAHAMA*2

Full grown starfish oocytes are arrested at the prophase of the first meiotic division. Meiosis resumes in response to the natural maturation-inducing hormone, 1-methyladenine (1-MA). Similar to the bioactivity of 1-MA, 1-benzyladenine is an active inducer of oocyte maturation in starfish; however, its biological activity decreases relative to the side-chain length at the N¹ site. To determine the stereo-specific properties of 1-MA receptors, we examined the maturation-inducing activity of several novel N¹-substituted adenines in the starfish *Asterina pectinifera*. 1-(*p*-Nitrobenzyl)adenine was found to induce oocyte maturation. Although 1-(*o*-nitrobenzyl)adenine, 1-(*m*-nitrobenzyl)adenine, 1-(2,4-dinitrobenzyl)adenine and 1-(*p*-methoxybenzyl)adenine showed no effect, 1-(*o*-nitrobenzyl)adenine and 1-(*m*-nitrobenzyl)adenine prevented 1-MA-induced oocyte maturation. Furthermore, these agonists and antagonists inhibited the binding of [³H]1-MA to receptors in oocyte cortices. The result obtained indicate that the regiospecific structure of the N¹ site may be important for activation of the 1-MA receptors.

緒 言

ヒトデ卵成熟誘起物質 (MIS) が1-メチルアデニン (1-MA) であることは故金谷晴夫博士ら^{1,2)}によって明らかにされている。1-MAは神経から分泌されるペプチド性ホルモン、生殖巣刺激物質 GSS の刺激を受けた濾胞細胞により合成される。ヒトデ未成熟卵は第一減数分裂前期で休止しており、その特徴として大きな卵核胞 (GV) を持っている。1-MA 処理後、未成熟卵は減数分裂を再開し、卵核胞の崩壊 (GVBD) を引き起こし、成熟する^{1,3)}。1-MA を直接卵母細胞にインジェクトしても卵成熟が誘起されないこと⁴⁾から、1-MA 受容体は卵母細胞膜表面に存在することが考えられ、実際確かめられている^{5,6)}。1-MA 受容体については、1-MA 自身が単に低分子であるばかりでなく、糖などを含まない

塩基の誘導体であることから活性部位との結合性など相互作用について極めて興味深い。これまで、アゴニストの特徴として1-MA関連物質による研究からアデニン環のN¹位に置換基が存在すること、N⁷、N⁹位において水素結合能が要求されることからN⁷、N⁹位に置換基が導入されていないこと、分子全体としては生理活性条件下で正の電荷を有すること、置換基の特性として疎水性を有することなどが必要と考えられている^{7,8)}。さらに、アルキル置換基において鎖長がのびるに従ってアゴニスト活性が低下するが、ベンジル基を有する1-ベンジルアデニン (1-BA) は天然の MIS である1-MA とほぼ同様の活性を持っていること³⁾が示されている。そこで、今回1-MA受容体の性質を理解するために1-BAをリード化合物として、そのベンゼン環

*1 帝京科学大学

*2 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所

上にニトロ基やメトキシ基を導入した化合物を合成し、ヒトデ卵成熟誘起作用に対する影響を調べた。

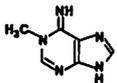
実験方法

1. 実験動物

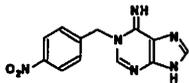
日本各地から繁殖期にあるイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) を採集し、実験に用いた。

2. 試薬

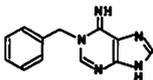
今回用いた 1-MA アナログを Fig. 1 に示した。1-MA (1) はシグマ社から購入した。1-BA (2)、1-(*o*-ニトロベンジル)アデニン (1-*o*NBA) (3)、1-(*m*-ニトロベンジル)アデニン (1-*m*NBA) (4)、1-(*p*-ニトロベンジル)アデニン (1-*p*NBA) (5)、1-(2,4-ジニトロベンジル)アデニン (1-*d*NBA) (6)、1-(*p*-メトキシベンジル)アデニン (1-*p*MtBA) (7) はデオキシアデノシンを出発材料として、N¹位をニトロ臭化ベンジル等で置換反応させ、最終的に糖を酸加水分解して合成した。1-[methyl-³H]メチルアデニン ([³H]1-MA) (3.11 TBq/mmol, 37 MBq/ml) はアマシャムの合成サービスに依頼した。



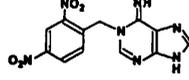
(1) 1-Methyladenine (1-MA)



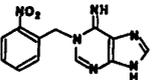
(5) 1-(*p*-Nitrobenzyl)adenine (1-*p*NBA)



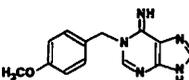
(2) 1-Benzyladenine (1-BA)



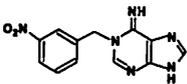
(6) 1-(2,4-Dinitrobenzyl)adenine (1-*d*NBA)



(3) 1-(*o*-Nitrobenzyl)adenine (1-*o*NBA)



(7) 1-(*p*-Methoxybenzyl)adenine (1-*p*MtBA)



(4) 1-(*m*-Nitrobenzyl)adenine (1-*m*NBA)

Fig. 1. Structures of the 1-MA analogs used in this study.

3. 卵成熟誘起作用

イトマキヒトデ卵母細胞を用いて各アナログの卵成熟誘起作用および 1-MA (0.1 μM) との拮抗作用について調べた。卵成熟の判定は試験液でのインキュベーション開始 1 時間後、卵核胞崩壊 (GVBD) の確認で行った。

4. 1-MA 受容体との結合実験

[³H]1-MA との結合実験には卵母細胞を Ca²⁺ 欠如海水で脱ゼリーした後、低張液処理し、さらに 27 ゲージの針穴を通すことで得られるコルテックスを用いた。コルテックス (2000-3000 個) は [³H]1-MA および各アナログと 20℃、30 分間インキュベートした後、放射活性を測定した。非特異的結合量は [methoxyl-¹⁴C] メトキシイヌリンから算出し、各々の特異的結合量はアナログが存在しない場合を 100% として求めた。

実験結果

Fig. 1 には、今回用いた N¹ 置換アデニンの構造式を示した。これら N¹ 置換アデニンのうち、これまで知られている 1-MA (1)、1-BA (2) 以外に、新たに 1-*p*NBA (5) においてイトマキヒトデ卵母細胞に対する卵成熟誘起作用が認められた (Table 1, Fig. 2)。一方、1-*p*NBA の位置異性体である 1-*o*NBA (3) や 1-*m*NBA (4) には、卵成熟誘起作用はなく、むしろ 1-MA に対して卵成熟作用を阻害するアンタゴニストとしての作用が認められた (Table 2, Fig. 3)。また、ベンゼン環にニトロ基を 2 つ持つ 1-*d*NBA (6) やニトロ基の代わりにメトキシ基を持つ 1-*p*MtBA (7) にはアゴニスト (Table 1) およびアンタゴニスト (Table 2)、どちらの作用も見出されなかった。

Table 1 Biological activity of 1-methyladenine and 1-methyladenine agonists

Compounds		EC ₅₀ (μM)
1-Methyladenine	(1)	0.05
1-Benzyladenine	(2)	0.07
1-(<i>o</i> -Nitrobenzyl)adenine	(3)	Inactive*
1-(<i>m</i> -Nitrobenzyl)adenine	(4)	Inactive*
1-(<i>p</i> -Nitrobenzyl)adenine	(5)	1.8
1-(2,4-Dinitrobenzyl)adenine	(6)	Inactive*
1-(<i>p</i> -Methoxybenzyl)adenine	(7)	Inactive*

EC₅₀ is expressed as the threshold concentration for inducing 50% germinal vesicle breakdown in starfish oocytes. Numbers in parentheses are chemical structures as shown in Fig. 1. *Higher concentration tested, 100 - 200 μM.

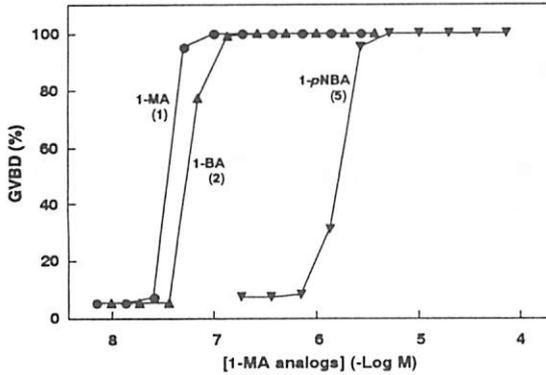


Fig. 2. Dose-response curve for the effect of 1-MA and its agonists on oocyte maturation in the starfish *Asterina pectinifera*. Biological activity in 1-MA (1)(●), 1-BA (2)(▲), and 1-*p*-NBA (5)(▼) was determined as described in Materials and Methods. Values are the mean \pm SEM of four different experiments. EC₅₀ values are given in Table 1.

Table 2 Effect of 1-benzyladenine derivatives on 1-methyladenine-induced maturation

Compounds	IC ₅₀ (μ M)
1-(<i>p</i> -Nitrobenzyl)adenine (3)	60
1-(<i>m</i> -Nitrobenzyl)adenine (4)	10
1-(2,4-Dinitrobenzyl)adenine (5)	Inactive*
1-(<i>p</i> -Methoxybenzyl)adenine (7)	Inactive*

In all experiments, 1-methyladenine was used at the concentration 0.1 μ M. IC₅₀ is the dose for 50% inhibition of oocyte maturation. Numbers in parentheses are chemical structures as shown in Fig. 1. *Higher concentration tested, 100 - 200 μ M.

次に、これら 1-MA に対してアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する 1-NBA 位置異性体について、受容体に対する [³H]1-MA との競合実験を行った。実験には、イトマキヒトデ卵母細胞より調整されたコルテックス (Fig. 4) を用いた。1-*p*-NBA (5)、1-*o*-NBA (3) および 1-*m*-NBA (4)、いずれも [³H]1-MA のコルテックスへの結合に対して非放射活性の 1-MA 同様に競合することが示された (Fig. 5)。

考 察

今回、合成した 5 種類の N¹ 置換アデニンから 1-MA 受容体との結合には N¹ 位の立体的位置関係が重要なことが示された。特に、1-NBA の位置異性体からは興味深い知見が得られた。パラ位にニトロ基を持つ 1-

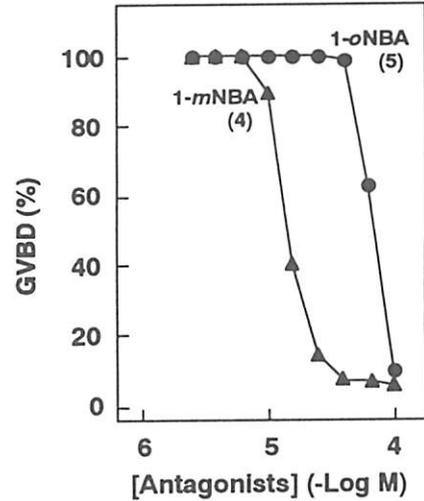


Fig. 3. Inhibition of 1-MA-dependent oocyte maturation by 1-*o*-NBA (3)(●) and 1-*m*-NBA (4)(▲). In all experiments, 1-MA was used at the concentration of 0.1 μ M. Values are the mean \pm SEM of four different experiments. IC₅₀ values are given in Table 2.

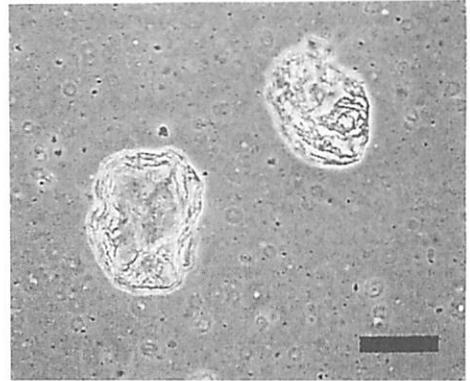


Fig. 4. Cortices isolated from full-grown prophase-arrested oocytes of the starfish *Asterina pectinifera*. Bar shows 10 μ m.

p-NBA (5) は卵成熟誘起作用、すなわち 1-MA のアゴニストとして作用したのに対して、ニトロ基がオルト位やメタ位についた 1-*o*-NBA (3)、1-*m*-NBA (4) では 1-MA に対してアンタゴニストとして作用したことである。これら 3 つの異性体は、ベンジル基にニトロが付くことでどれも同程度の電子吸引性の性質を持つことが考えられる。アデニンの N¹ 位に対する電子吸引性の性質は重要である。なぜなら、分子的にニトロ基とはほぼ同

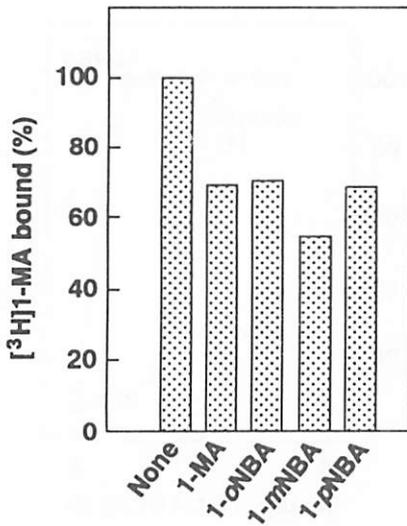


Fig. 5. Competition between $[^3\text{H}]1\text{-MA}$ and its analogs for the binding to receptors in oocyte cortices from starfish *A. pectinifera*. Oocyte cortices were incubated at 20°C for 30 min with a mixture of $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]1\text{-MA}$ and 0.1mM unlabeled analogs. The specific binding of $[^3\text{H}]1\text{-MA}$ in the absence of unlabeled analogs was taken as 100%. Values are the mean \pm SEM of triplicate determinations of a representative experiments.

じ大きさのメトキシ基を持つ $1\text{-}p\text{MBA}$ (7) はアゴニストにもアンタゴニストにもならなかったが、これはメトキシ基が N^1 位にむしろ電子供与体として作用するためだと考えられるからである。それでは、なぜパラ位とその他ではその作用が異なるかということ、やはり受容体タンパクとの立体的配置によるものだと考えられる。 1-NBA 位置異性体がいずれも $[^3\text{H}]1\text{-MA}$ のコルテックスへの結合に対して競合することから、受容体タンパク質に何らかの影響を与えていることは確かである。すなわち、 N^1 位に対して電子吸引性の置換基が受容体との相互作用に重要だとしても立体的障害があれば、アゴニストとしての作用は弱くなり、むしろプリン環に近いオルト位やメタ位のニトロ基は受容体タンパクとの結合に支障を来し、 1-MA のアンタゴニストとして作用してしまう可能性があると思われる (Fig. 6)。このことはニトロ基を持つにもかかわらず生理活性のみられなかった 1-dNBA (6) にも当てはまるだろう。今回の結果は、将来の 1-MA 受容体に対する光親和性ラベルが可能な標識化合物の設計、合成に有益であると思われる。

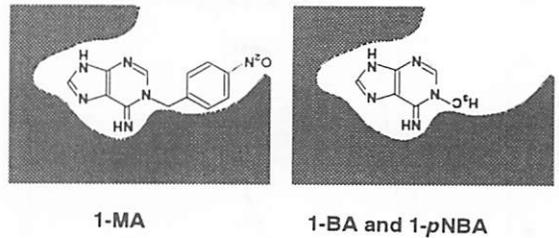


Fig. 6. Model of the stereo-specific properties of 1-MA , 1-BA and $1\text{-}p\text{-NBA}$ with its receptors.

要 約

十分发育したヒトデの卵母細胞は第一減数分裂前期で休止しており、そのままでは受精し、正常に発生することはない。これら未成熟卵の減数分裂の再開には卵濾胞細胞で生産される卵成熟誘起物質、 1- メチルアデニン (1-MA) の刺激を必要とする。これまで 1-MA は卵母細胞膜表面にある受容体に作用することが考えられている。本研究は卵成熟誘起機構における 1-MA とその受容体との相互作用を明らかにする目的で、 1- ベンジルアデニン (1-BA) が 1-MA に匹敵する卵成熟誘起作用をもつことに注目し、ニトロベンジルアデニンなどの N^1 置換誘導体を新たに設計・合成し、 1-MA 受容体との相互作用について解析した。 1- ニトロベンジルアデニン (1-NBA) の位置異性体のうち $1\text{-}p\text{-NBA}$ にはアゴニストとしての作用がみられたのに対して $1\text{-}o\text{-NBA}$ や $1\text{-}m\text{-NBA}$ にはアンタゴニストの作用がみられた。このことから、受容体タンパク質との相互作用には N^1 置換基の立体的位置関係が重要と考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたってご指導、ご協力をいただいた早稲田大学教授安増都夫博士に心から感謝いたします。一連の研究に用いたヒトデの採集に協力いただいた東北大学理学部附属浅虫臨海実験所、お茶の水女子大学理学部附属館山臨海実験所のスタッフの皆様にお礼を申し上げます。本研究は文部省科学研究費補助金 (09640797) から研究助成を得て行いました。

引用文献

- 1) Kanatani, H.: *Int. Rev. Cytol.*, 35, 253-298 (1973)
- 2) Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K., and Kurokawa, T.: *Nature*, 221, 273-274 (1969)
- 3) Meijer, L., and Guerrier, P.: *Int. Rev. Cytol.*, 86, 129-

195 (1984)

- 4) Kanatani, H., and Hiramoto, Y.: *Exp. Cell Res.*, 61, 280-284 (1970)
- 5) Yoshikuni, M., Ishikawa, K., Isobe, M., Goto, T., and Nagahama, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1874-1877 (1988)
- 6) Tadenuma, H., Takahashi, K., Chiba, K., Hoshi, M., and Katada, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 114-121 (1992)
- 7) Kanatani, H., and Shirai, H.: *Develop. Growth & Differ.*, 12, 53-63 (1971)
- 8) Monsees, T., Meijer, L., and Jastorff, B.: *Eur. J. Biochem.*, 213, 155-165 (1993)
- 9) Mornet, R., Leonard, N.J., Theiler, J.B., and Doree, M.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 879-885 (1984)