

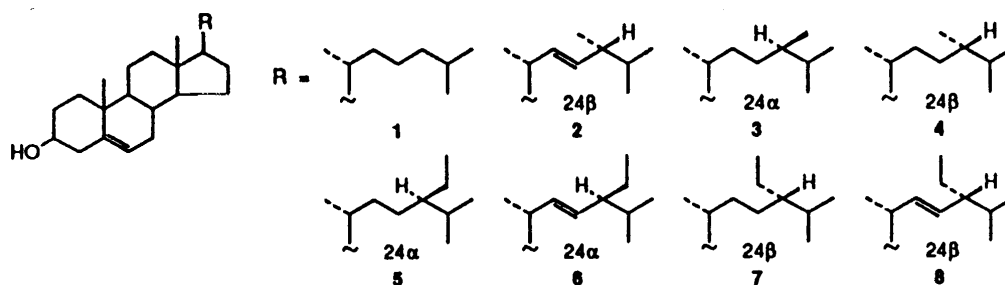
植物ステロールの分離

(リサイクルを利用した逆層 HPLC の応用)

塩野義製薬(株) 研究所 妹尾修次郎

1. はじめに

ステロールは真核生物の細胞の膜の構成成分として重要な役割をはたしているが、側鎖の構造が動物、植物、カビ等生物によって少しずつ異なるステロールを合成している。昆虫はステロールを生合成する能力を持たないので、餌の植物に含まれるステロールを利用している。ヒトや動物(脊椎動物)ではコレステロール(1)を合成している。最近、血中のコレステロール値が高すぎると動脈硬化の原因となる事が明らかにされ、無ければ困るけれども多すぎると害を及ぼすことがわかり、血中コレステロール値をコントロールする目的で生合成阻害剤が開発された。

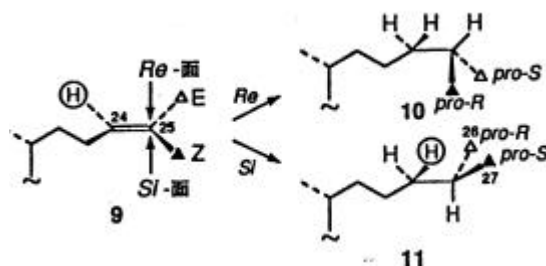


一方、カビではコレステロールの側鎖の 24 位に の立体配位のメチル基を持つステロール(ergosterol 2)を生合成している。光合成植物である高等植物のステロールは幾種類かの混合物であり、24-メチルステロールは 24 位が 転位の campesterol (3)と 配位の dihydrobrassicasterol(4)が共存する。24-エチルステロールは 24 位が 配位を持った sitosterol(5).stigmasterol(6)のようなステロールが一般的である。光合成植物の中でも 緑藻類では 24-エチルステロールは 24 位が 配位を持った clionasterol(7).poriferasterol(8)を含むものが多い。このように 24 位の置換基の種類と立体配位は生物の種によって特徴があり、生物の進化と関係しているように見える。高等植物のうちで 24-エチルステロールを持つウリ科の植物は藻類の性質を残しているとも考えることが出来るのかも知れない。そこで種々のステロール側鎖の生合成的な関係について調べてみた。

逆層 HPLC の進歩によって、このような非常によく似た化合物の分解、分取が容易になり、特に 24- と 24-メチルステロール(3),(4)の分離精製はリサイクル逆層 HPLC によって初めて可能であった。

2. ステロール側鎖の生合成

ステロール側鎖の 24 位のアルキル基は生合成的には S-adenosylmethionine(SAM)のメチル基に由来しており、母核の生合成中間体(動物、カビでは lanosterol。植物では cycloartenol)の側鎖(9)の 24(25)二重結合の 24 位がメチル化されて 24-メチルステロールが、そこにもう一度メチル化が起こって 24-エチルステロールが

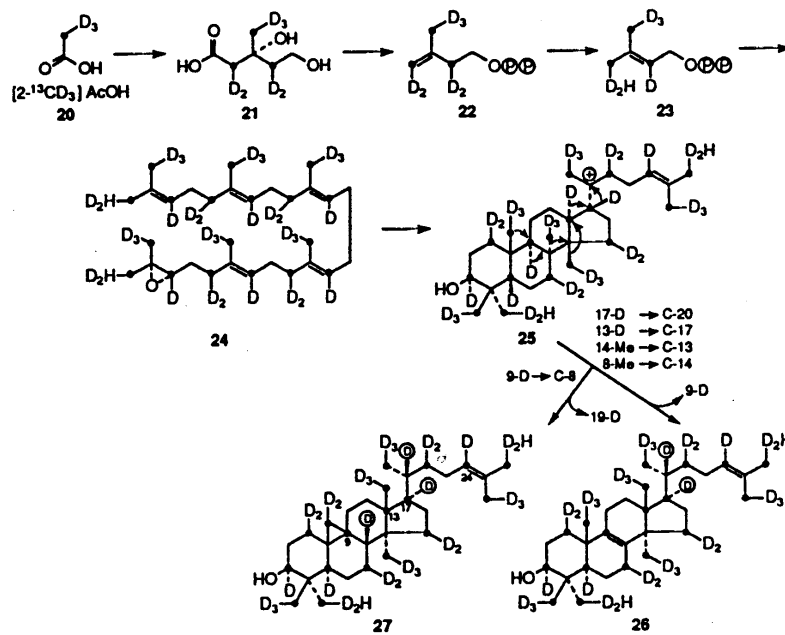
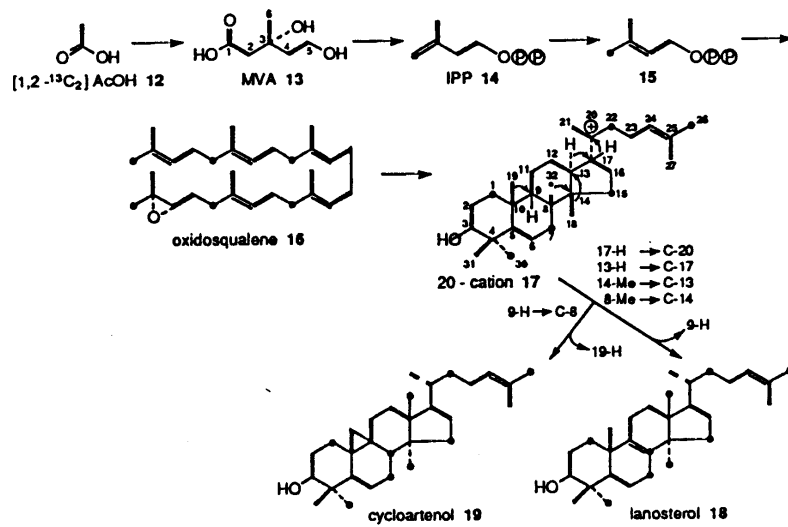


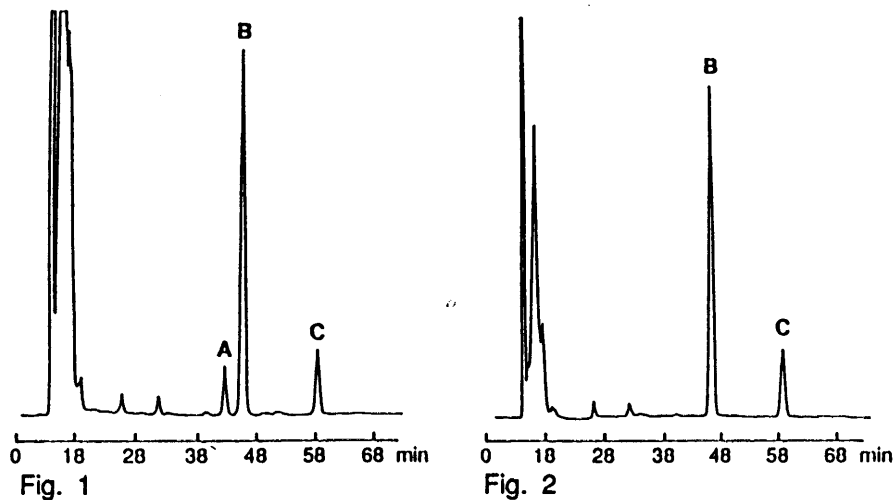
生成する．コレステロールはアルキル化の代わりに水素の付加が起こって生成する 25 位にはいずれも水素が付加している．アルキル基が 配位になるか 配位になるかは、SAM が二重結合を攻撃するとき二重結合の Re-面から近づくか Si-面から近づくかによって決定されるのではないかと考えられた．もしそうだとすると、25 位への水素の付加はアルキル基と cis か trans かどちらかである．これを調べるためには中間体 (9) の E () - または Z () - メチル基をラベルしておいて、水素が付加した後にラベルしたメチル基が pro-R (C-26) pro-s(C-27)かどちらのメチル基になったかを調べればよい．しかし、生成するイソプロピル基の二つのメチル基を識別することは化学的には非常に困難が予想される．幸いに C - 26 と c - 27 に相当する ^{13}C NMR シグナルが別々に現れるので、シグナルの帰属をして、安定同位体を用いて調べることにした．安定同位体を NMR で観測するためには、安定同位体の取り込み活性が高い必要があるので、カビは yeast 菌、動物はイヌの遊離肝細胞、植物はいろいろな植物からカルスを誘導して得た培養細胞を用いた

2-1. 24 (25) ステロールの E および Z メチル識別

Ruzicka らの提唱した"Biogenetic isoprene rule"1 によると lanosterol は 3 分子の酢酸から mevalonic acid (MVA)を経て isopentenyl PyroPhosphate (IPP), dimethylallyl pyrophosphate の isoprene unit となり、これが 6unit 縮合し C30 の squalene が生成する.squalene は酸化を受けた後 cyclase によって閉環し、水素とメチル基が転移して lanosterol が生成することになっている．事実イヌの肝臓から調整した遊離肝細胞を 14-demethylation 阻害薬である SSF-109 存在下[1,2- ^{13}C 2]Acetate とインキュベートすると lanosterol(18)が蓄積した．(Fig.1) 逆層 HPLC で C30 の (18) は C27 の cholesterol より r.t が短かった．(18)の ^{13}C NMR スペクトルは構造式に示すような [1,2 - ^{13}C]acetate の取り込みを示し．E - メチルがシングルラベル、Z - メチルがダブルラベルとなり、二つのメチル基は区別されていた 2.これは MVA(13) から IPP (14)になるとき MVA の C - 1 が脱炭酸して失われるため ^{13}C - ^{13}C ボンドが切断されて HVA の C - 2 に由来する炭素は孤立した ^{13}C となる．lanosterol の E - メチルは MVA の C - 2 に由来しているためにシングルラベルとして Z - メチルと区別された事になる．

同じようにイヌの遊離肝細胞を SSF-109 存在下[2- ^{13}C 3]acetate(20)とインキュベートすると (26) で示されるようにラベルされた lanosterol が得られた．(18)





HPLC analysis of non-saponifiable lipids from isolated dog hepatocytes, Fig. 1 : treated, and Fig. 2 : untreated with SSF-109 (200 μ g/ml) in the presence of [1,2- 13 C₂]acetate. A ; lanosterol, B ; cholesterol and C ; squalene. HPLC conditions : column, YMC pack A312 connected with Develosil ODS T-5 ; solvent, MeOH 1ml/min, UV 210 nm.

の場合と同じ理由で E - メチルが CD2H でラベルされ、Z - メチルが CD3 でラベルされた。

植物では lanosterol の代わりに cycloartenol がステロール生合成の中間体である。ペルー産のナス科の植物である *Phyllis peruviana* から誘導したカルスを [1,2- 13 C₂] Acetate (12) または [2- 13 CD₃] Acetate (20) とインキュベートして

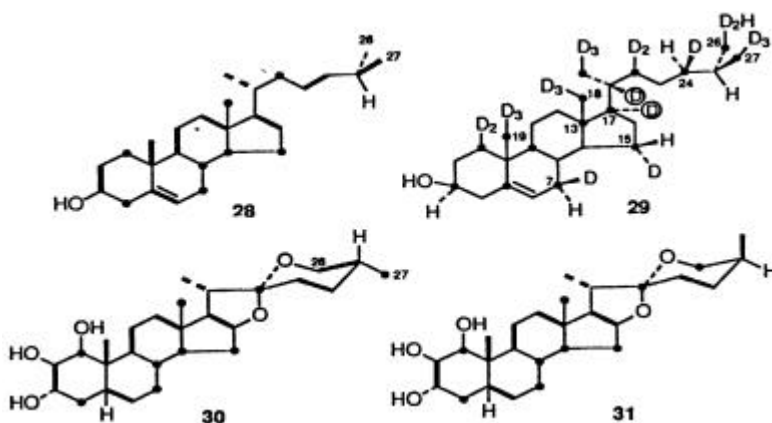
=C でラベルされた cycloartenol (19) と =CD でラベルされた cycloartenol (27) を得た。25 位の E - メチルと Z - メチルは lanosterol の場合と同様に生合成的にラベルすることによって識別することができた。

2-2. コレステロール側鎖の生合成 2

イヌの遊離肝細胞を阻害剤 (SSF - 109) 無しに [1,2- 13 C₂] Acetate (12) または [2- 13 CD₃] Acetate (20) とインキュベートするとコレステロールまで進行して、 13 C でラベルされた cholesterol (28) と 13 CD でラベルされた cholesterol (29) を得た。(Fig. 2) 別途に [26-D]-12R-cholesterol と [26-D]-25S - Cholesterol を合成して 25 位の Pro-R (C - 26) と Pro-S (C - 27) メチル基の 13 C NMR シグナルの帰属 (22.57 が C - 26 に 22.83 が C - 27) に基づいて、(28) と (29) のラベルのされ方を見ると、lanosterol の E - メチル基は cholesterol の C-26 に、また Z - メチル基は C-27 になるように lanosterol の 25 位に水素が付加したことになり、Popjak らの得た結果と一致した。つまり 25 - Si - 面から水素が導入され

た事(9-11)を示している。24-位にはSi-面から水素が導入される事が報告されているので cis 還元が起こった事になる。

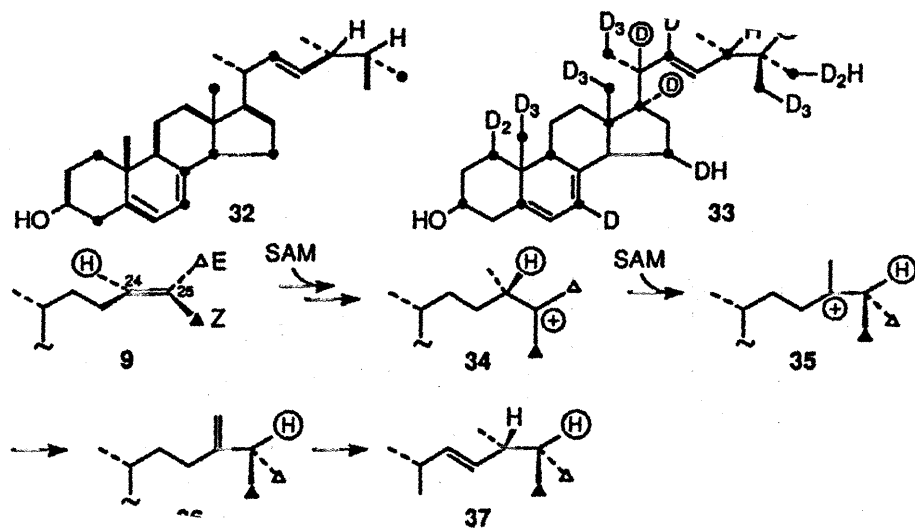
植物のコレステロールは cycloartenol (19) を経て生合成される。一般には少量しか含まれていないがステロイドサポゲニン(19)はコレステロールから生合成されることが知られている。ヤマノイモ科の *Dioscorea tokoro* から誘導したカルスは tokorogenin と neotokrogenin を産生するので、この培養細胞を [1,2-13C2] Acetate (12) とインキュベーションして 13C でラベルされた tokorogenin (30) と neotokrogenin (31) を単離した。これらのラベルのされ方から元の cycloartenol(19)から生成する植物性のコレステロールも動物の場合と同じく 25-Si-面から水素化されて (9-11) 出来ることを示していた。



2-3, 24-メチルステロール側鎖の生合成

カビ: yeast と [1,2-13C2] Acetate (12) または [2-13CD3] Acetate (20) とインキュベートして 13C でラベルされた ergosterol (32) と 13CD でラベルされた ergosterol (33) を単離した。(32) のラベルのされ方から 25 位への水素化はコレステロールの場合とは逆の Re-面から起っていることがわかった。しかしながら (33) では 25 位が D-ラベルされておりこの D 原子は 24 位から転移してきたことを示していた。

[methyl-D3] methionine を yeast に投与して得られる ergosterol には D 原子は 2 コしか取り込まれないことを考えるとエルゴスチロールの側鎖の生合成は lanosterol 側鎖(9)の二重結合がメチル化され 25-カチオン(34)ができる。このカチオンに 24 位の水素が転移し次いでメチル基から水素が脱離して 24-メチレン中間体(36)となり、24(28)二重結合が還元され(37)て 24 位と 25 位の立体が形成されたと考えられる。



植物：キョウチタトウ科のチョウジソウ (*Amsonia elliptica*) のカルス⁵は高等穂物としては珍しく 24 - メチルステロールが 24 - エチルステロールより多く含まれる．このキョウチタトウのカルスに「1.2-13C2」Acetate (12) を投与してステロール各分を得た．動物やイーストの場合と異なり、植物のステロール各分は Fig. 3 に示すように逆層 HPLC 上数多くのピークを示すため 20mm の YMCA pack ODS を用いたリサイクル LC によって 24 - メチルステロールを他のステロールから分離した．この 24 - メチルステロールは NMR から camsterol (CMP) と dihydrobrassicasterol (DHB) の混合物であることがわかった．そこで更にこの画分を DeveloSil ODS T - 7(s-7) (250 x 20mm) のカラムを用いてリサイクルで廻すと 20 回目ではほぼベースライン分離することに成功した．(Fig.4) 13CNMR から得られたラベル様式は 24 - メチル基を持つ CMP(38)で示され、25 位への水素化はコレステロールと逆の Re-面から起こっていた．一方 24 - メチル基を持つ DHB は (39) で示され、25 位にはコレステロールと同じ．Si 一面から水素化が起こったことを示した．ナス科の *Physalis preuviana* の CMP と DHB でも同じ結果を得た．

次に[2 - 13CD3]Acetate (20) を同じカルスに投与し、上と同様に逆層のリサイクル HPLC を用いて CHP と DHB を単離した．13CD のラベル様式を調べるために {1H} {2H} 13CNMR を観測したところ CMP は (40) で示されるようにラベルされていた．ところがここで得られた DHB の 13CNMR スペクトルでは 13CD ラベルに由来するシグナルが非常に弱く、DHB への [2 - 13CD3] Acetate の取り込みが CMP に比べて悪いのではないかと考えられた．取り込みを上げるために、1 週間毎に [2 - 13CD3] Acetate を 4 回パルス投与した後、CMP と DHB を単離したが CMP への取り込みは上がったが DHB への取り込みはあまり改善されなかった．CMP の 13C スペクトルを注意して見ると DHB の 13CD ラベルに由来するシグナルだけが CMP の中に 混在してる様に見えた．

次に 2 回パルス投与をしてリサイクルする前の CHP と DHB の混合物の 13C スペクトルを測定した．するとシグナルが重なり合って十分な解析は出来ない

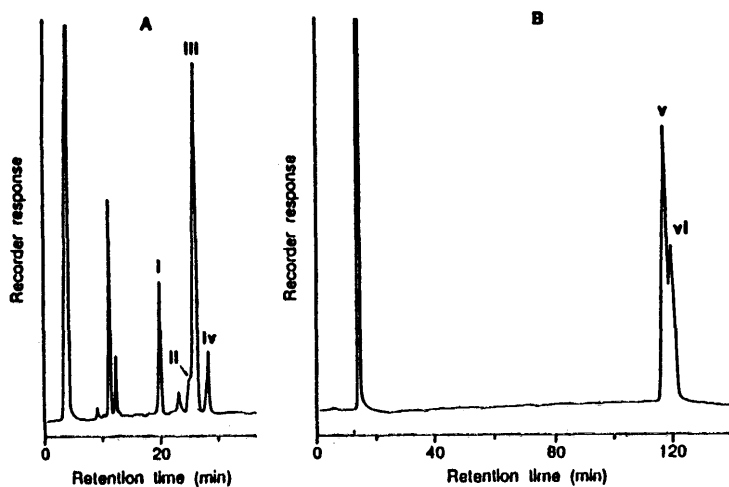


Fig. 3. HPLC analysis of (A) a crude Δ^5 -sterol fraction in tissue cultures of *Amsonia elliptica*, and (B) an epimeric mixture of 24-methylcholesterol (v,vi). Each peak is identical with 24-methylenecholesterol (I), stigmasterol (II), an epimeric mixture of 24-methylcholesterol (v,vi), sitosterol (IV), campesterol (V), and dihydrobrassicasterol (VI), respectively. Conditions: (A) column, YMC pack A312 ODS 150x6 mm i.d.; solvent, MeOH 0.8 ml/min; (B) column, Develosil ODS T-7 250x10 mm i.d.; solvent, MeOH 1 ml/min; detected by UV at 210 nm.

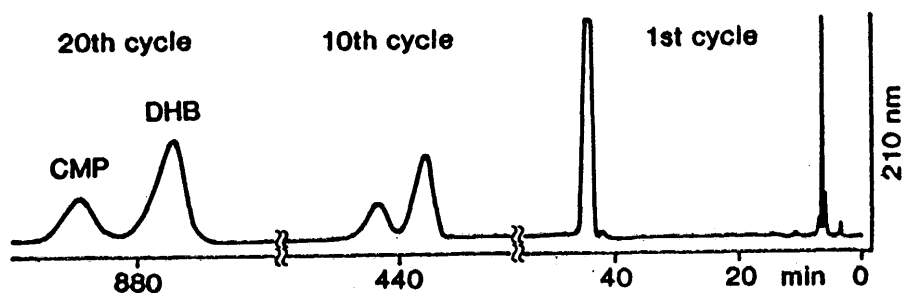
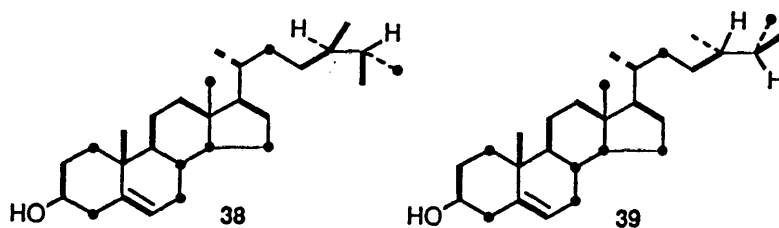
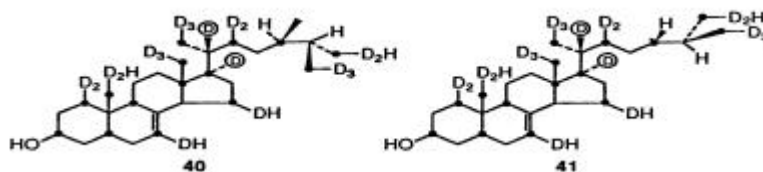


Fig. 4 RP Recycle HPLC of a mixture of CMP (38) and DHB (39) obtained from *A. elliptica* cells fed $[1,2-^{13}C_2]$ acetate. (Develosil ODS T-7 (250x26 mm Φ), MeOH 9 ml/min LC-908 system, UV 210 nm.)





が、明かに DHB にも CMP と同じ程度に取り込まれていることがわかった。つまり逆層の HPLC を 20 回リサイクルすると、重水素による Isotope - effect により retention time が軽水素化合物より速くなり、前のピークに重なってしまったものと予想した。そこでリサイクル HPLC で分取するときに、先に出る CMP のピークの後ろ側のすそを、DHB と併せて分取した。こうして得られた HBD の{1H} {2H} ¹³CNMR は十分な ¹³CD の取り込みを示し、取り込み様式は (41) の様であった。(40) と (41) を比べると、¹³C ラベルした (38) と (39) で観測されたように 25 位の水素

が互いに反対方向から起こっている (CMP の C - 27 と DHB の C - 26 が ¹³CD₂H で、また CMP の C - 26 と DHB の C - 27 が ¹³CD₃ でラベルされた) 以外には全く同じであった。

¹³CD ラベルの ergosterol(33) で見られた 25 位に転移した D は観測されなかった。この違いを調べるために [methyl-D₃]methionine をチョウジソウのカルスに投与して CMP と DHB 混合画分を得た。21 回のリサイクル HPLC を廻した後 (Fig. 5) に示すように各ピークを 3 つのフラクション (a-c,d-f) に分けて分取した。Fig.6 に示した a から f のマススペクトルから、明かに最大 2 コの重水素が取り込まれている事がわかった。CMP と DHB 両方ともピークのフロント側 (a,d) で D₂ 体に相当する M+2(m/z402) が大きく、D 原子 2 コのラベルで HPLC 上で Isotope effect の傾向がみられた。

以上の結果から、CMP と DHB の側鎖の生合成は下図に示すように進行すると考えられる。cycloartenol の側鎖(9) から(36) 迄は ergosterol の場合と同じように進行した後、25 位の水素の脱離を伴って二重結合が転移し (42) となる。(42) の 24 (25) 二重結合が還元されて 24 位と 25 位の立体が互いに逆の CMP と DHB の側鎖 (43) と (44) が生成する。(36) の側鎖を持つステロールは 24 - methylenecholesterol 7 と 24 - methylenecycloartanol 3 が Physalis peruviana と Dioscorea tokoro から得られ、共に 25 位には 24 位から転移した D が保持されていて、その配位はコレステロールとは逆の Re-面からの転移を示した。

2-4. 24 エチルステロール側鎖の生合成

植物ステロールとして最も分布の広い sitosterol は 24 - エチル基を持つ。sitosterol への [1, 2 - ¹³C₂] Acetate と [2 - ¹³CD₃] Acetate の取り込み様式を、シソ科の(ヒキオコシ), ヤマイモ科の D. tokoro (オニドコロ), セリ科の Bupleurum falcatum (ミシマサイコ) から誘導したカルス用いて調べた。sitosterol の C-26 と C-27 の ¹³C シグナルの帰属は、別途に[26-D]-(25R9-and(25S)-sitosterol を合成して行った 9。結果 sitosterol は(45)と(46)で示されるようにラベルされてい

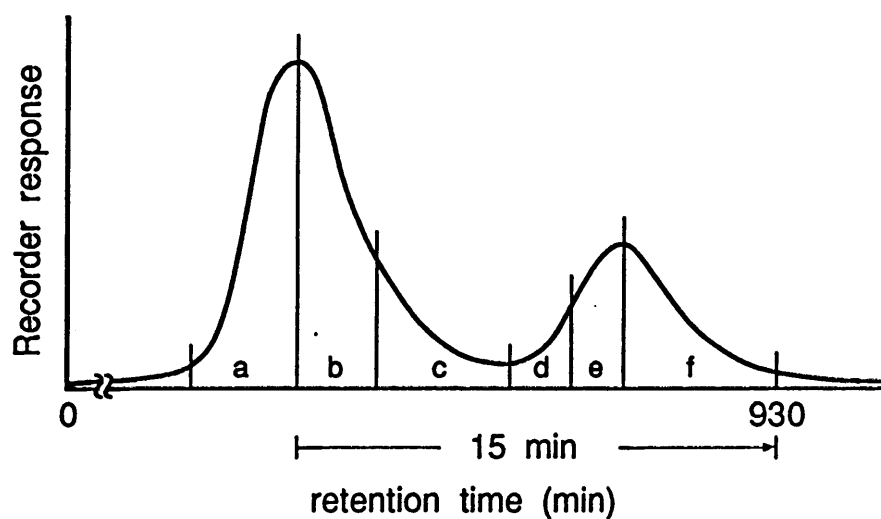


Fig. 5. Fractionation of campesterol (v) and dihydrobrassicasterol (vi) into a, b, c, d, e, and f portions using recycling preparative HPLC. Conditions: column, Develosil ODS T-7, 250x20 mm i.d.; solvent, MeOH 9 ml/min; detected by UV at 210 nm.

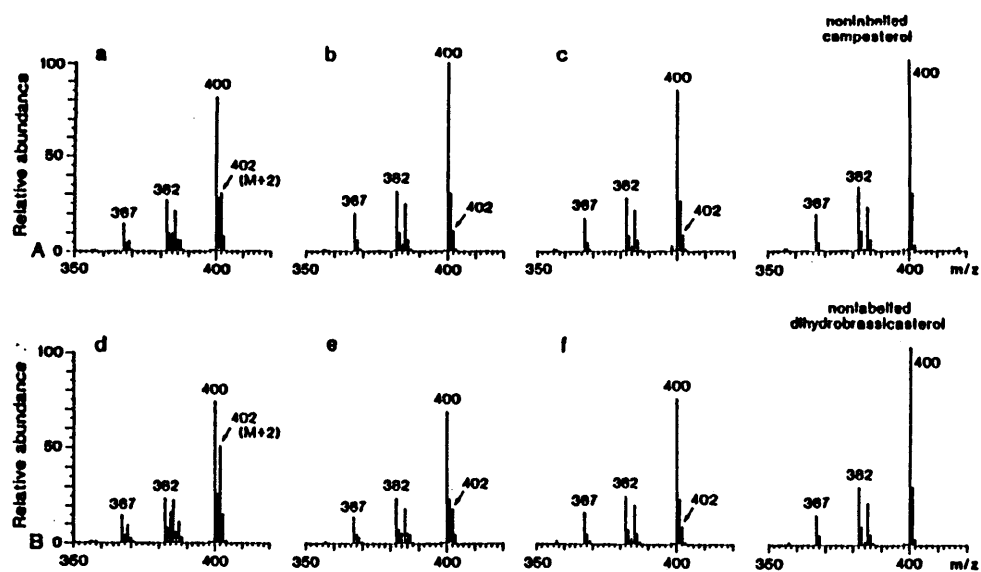
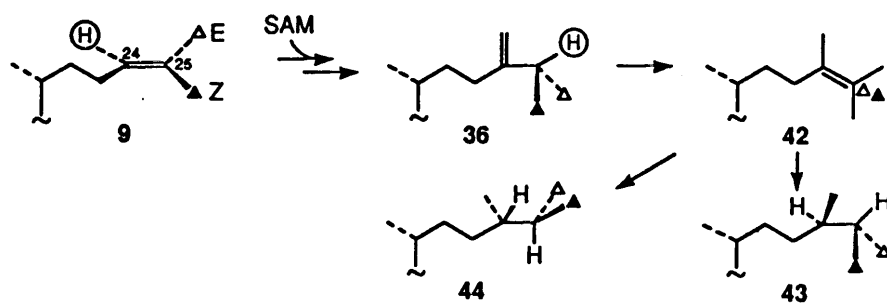


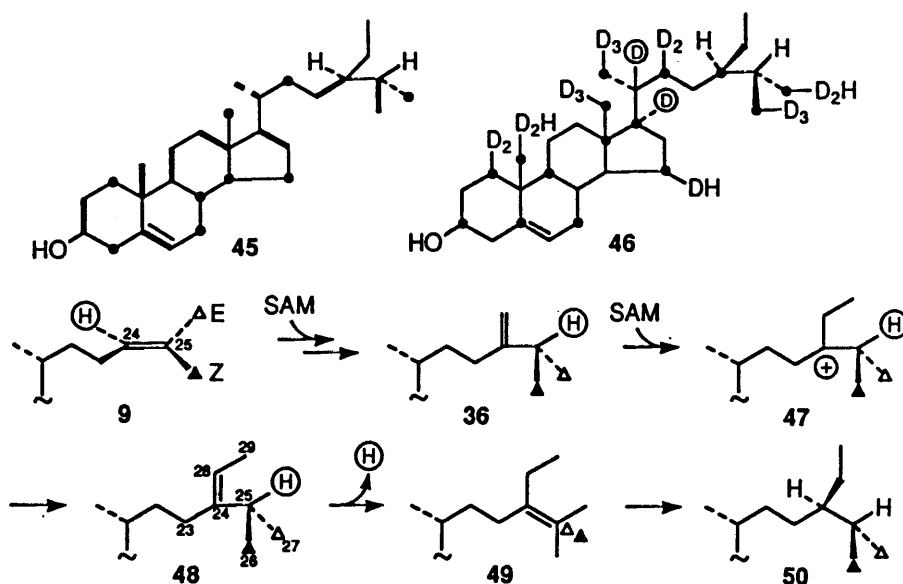
Fig. 6 Mass spectra above m/z 350 of each fraction in Fig. 5. a, b, c; CMP and d, e, f; DHB obtained from *A. elliptica* cells incubated with L-[Me-D₃]methionine.



た3. 25位には転移したDは観測されなかったが、水素化の方向はコレステロールと逆であった.

さらに [methyl-D3]methionine の取り込みを *P. peruviana* で調べたら sitosterol へは最大4コのDの取り込みを示しエチル基の5コの水素の内1コはメチオニン以外の水素に由来していることがわかった.

以上の結果から、24-エチル基をもつ sitosterol の生合成は cycloartenol の側鎖 (9) からメチル側鎖の生合成中同体 (36) を経て、(36) がもう一度メチル化されて 24-カチオン (47) となり、28位かち水素が脱離して 24-エチリデン側鎖 (48) (isofucosterol) を生成する 24 (28) 二重結合が転移して中間体 (49) となり 25 位の水素が一旦失われる. 最後に 24 (25) 二重結合が還元されて sitosterol 側鎖 (50) が生成すると考えられる. 25 位への水素化はオーバーオールでコレステロールとは逆から入ったことになる. isofucosterol (48) が *P. peruviana* のカルスから得られ確認した. (Fig. 7)



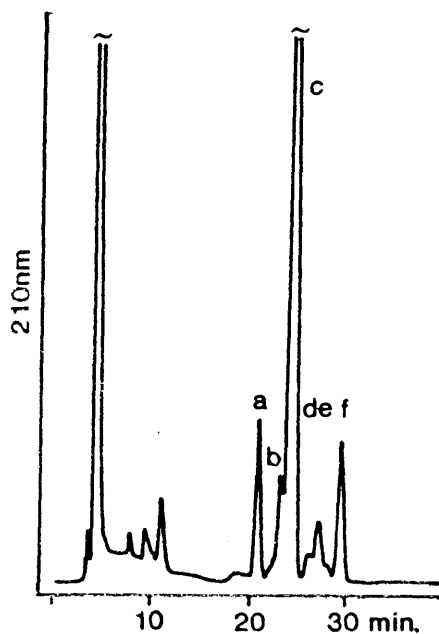


Fig. 7

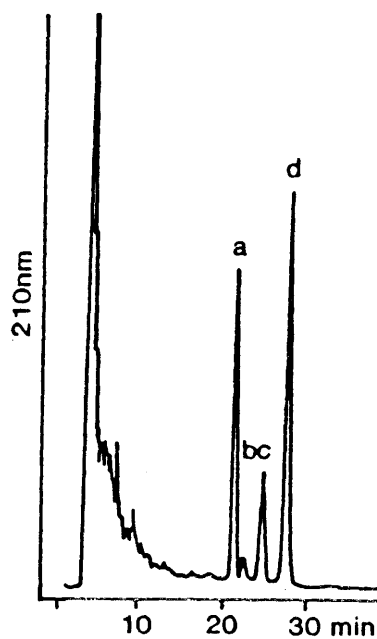


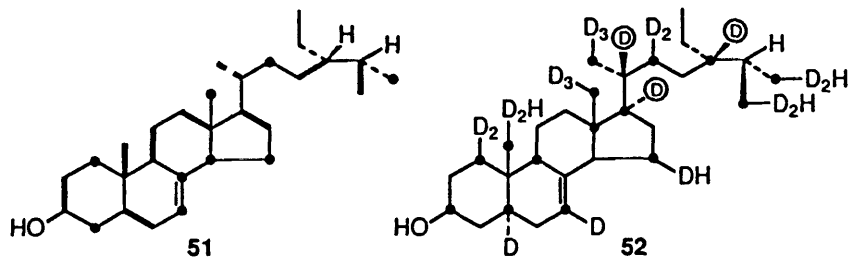
Fig. 8

Fig. 7 HPLC profile of a sterol fraction of *P. peruviana* :
 a, 24-methylenecholesterol ; b, unknown ; c, isofucoesterol ;
 d, CMP and DHB ; e, stigmasterol ; f, sitosterol.

Fig. 8 HPLC profile of a sterol fraction of *T. kirilowii* :
 a, 22-dihydro-25-dehydro chondrillasterol ; b, unknown ;
 c, chondrillasterol ; d, 22-dihydrochondrillasterol.

HPLC conditions : Column, YMC A312 (150×6 mm Φ),
 solv., 0.8 ml/min, UV, 210nm.

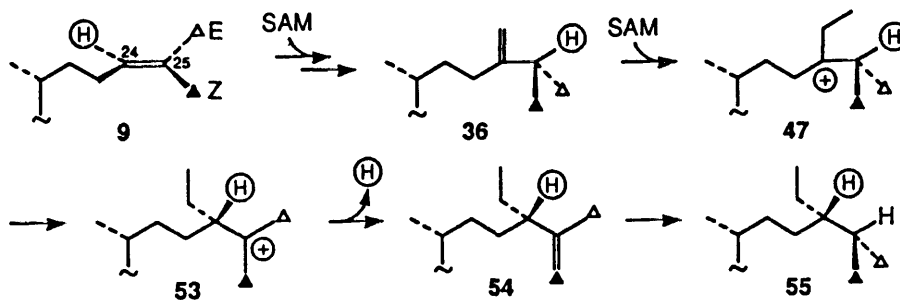
一方、24 - エチルステロールは緑藻類に多く含まれるが、植物ではクマツツ
 ラ科の植物に含まれることが知られている。最近ウリ科の植物で、種子中には24
 -エチルステロールがあって11、成熟すると24 - エチルステロールが増加してく
 ることがわかってきた12。24 - エチルステロール側鎖の生合成について、ウリ科
 の *Trichosanthes Kirilowii* (キカラスウリ) のカルスを用いて、〔1 - 2 - 13C2〕 Acetate と
 〔2 - 13CD3〕 Acetate を投与して 22 - dihydrochondrillasterol への取り込みを調べた。
 (Fig. 8) 結果は(51) (52) で示されるラベル様式を得た13。(51)を13Cラベルの
 Sitosterol (45) と比べると、両者とも25位への水素付加は同じ方向 (Re 一面)
 から起こっているため、24 - メチルステロールの場合とは異なる経路で生成したこ
 とを示している。(52) では24位にDが保持されていて、さらにMVAのC-6に由来す
 るC-27にDが2コしかなく、Dが1コ脱離したことを物語っている。このカルス
 は同時に25(26)に二重結合のある 22 - dihydro - 25 - dehydrochondrillasterol (側鎖
 54) を産生するのでこの化合物を経由して生成するものと考えられる。



次に [methyl-D₃]methionine の取り込みを調べると、Dは最大5コ取り込まれていた¹⁴。以上の結果から24β-エチルステロール側鎖は、24α-エチル側鎖のカチオン中間体(47)の25位の水素が再び24位へ転移して、同時に27位から水素の脱離が起こって25(26)二重結合が生成する。最後に25(26)の二重結合の還元がRe一面から起こるとゆう経路で生成すると考えられる。

このキカラスウリの24β-エチル側鎖の生合成経路はクロレラで報告されている経路と一致する。

Chart. 1 にステロール生合成ルートをまとめた。



3. 逆層HPLCでの Deuterium Isotope Effect¹⁵

GLCでは重水素標識した化合物と非標識化合物が分離することが良く知られている。CMP と DHB で述べたようにHPLCでも重水素標識した化合物が分離して

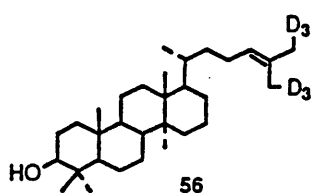
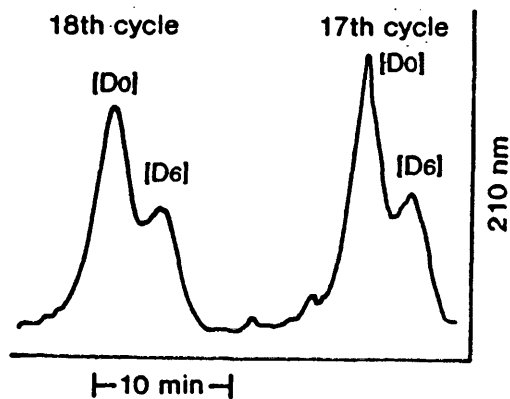


Fig. 9 RP 21 redycle HPLC of a mixture of [D₆]cycloartenol (56) and [D₀]cycloartenol, (Develosil ODS (T-5) (250×10 mm Φ), MeOH (6 ml/min); LC-908 system, UV 210 nm).



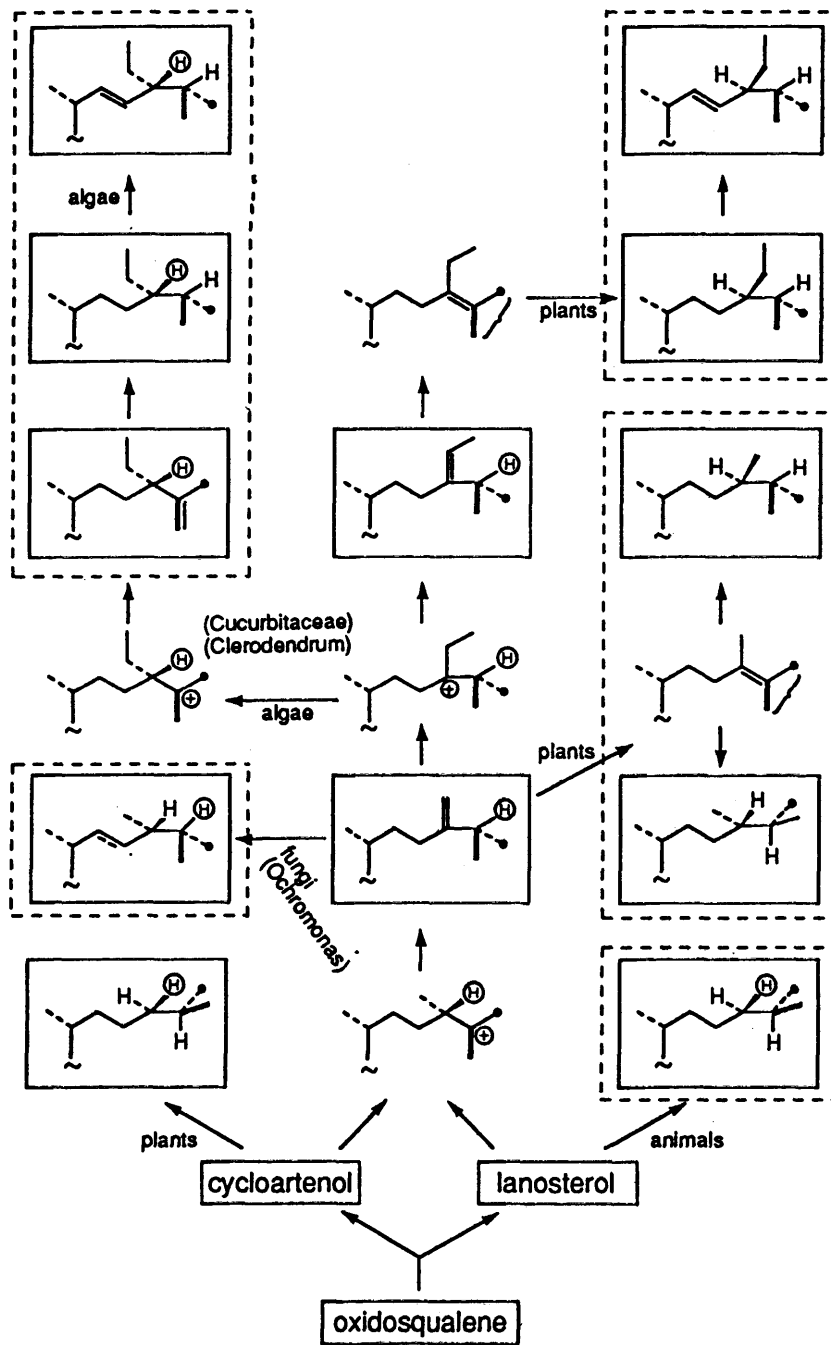


Chart 1

いる傾向が見られた．このことを確かめるためにモデルとして cycloartenol の 26 位と 27 位を D6 ラベルした化合物 (56) を合成した．DeveloSil ODS (T-5) (250x10 mm) カラムを用い、非標識体とともに 18 回のリサイクルをした．Fig. 9 に示すように D 標識体は先に溶出した．各ピークを 2 分画して分取し、MS を測定すると、前のピークは [d6] cycloartenol (56) に一致し、後ろのピークは非標識体と一致した．従って逆層 HPLC でも Deuterium Isotope Effect によって重水素化合物が分離することがわかった．

植物ステロールは側鎖の構造が少しずつ異なる化合物の混ざりであり、その生成するメカニズムの違いを調べるために、植物培養細胞を用いて、安定同位体をトレーサーとし、逆層リサイクル HPLC で分離精製を行って、¹³C NMR で観測した．結合の異なるステロール側鎖の生合成の最後のステップは、還元される二重結合が 24 (28) と、24 (25) と、25 (26) と 3 つの場合がある．25 位の水素は cholesterol と dihydrobrassicasterol だけが Si 一面から導入されていて、他のステロールは逆の Re - 面から導入されていた．

逆層リサイクル HPLC を用いる利点として、1) 分析条件がそのまま分取に適用でき、2) 分取に際し予め分離状態がクロマトグラムとして知ることが出来ることの二点は便利であった．またオーバーロードや検体を高濃度に溶かす時の溶媒などの影響もリサイクルする間に軽減された．

謝辞 本研究は東大薬学部 (三川教授、海老塚助教授、野口縛士)、東大応微研 (瀬戸教授)、シオノギ研究所 (武田、魚森、吉村、中川、堀部) の共同研究として行った．以上の方々に感謝します．

References

- 1) A. Echenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, 1955.
Helv. Chim. Acta, 38: 1980-1904.
- 2) S. Seo, H. Saito, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Tonda, Y. Nishibe, M. Hirata, Y. Takeuchi, K. Takeda, H. Nogechi, Y. Ebizuka, U. Sankawa, H. Seto, 1991. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2065 - 2072.
- 3) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Takeda, H. Seto, Y. Ebizuka, H. Nogechi, U. Sankawa, 1989. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 261 - 263.
- 4) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Tori, 1984.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 869 - 874.
- 5) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Takeda, H. Seto, H. Nogechi, Y. Ebizuka, U. Sankawa, H. Seto, 1992.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: in press.
- 6) A. Uomori, Y. Nakagawa, Y. Yoshimatsu, S. Seo, U. Sankawa, K. Takeda, 1992. Phytochemistry: in press.
- 7) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Takeda, 1983.
J. Am. Chem. Soc. 105: 6343 - 6344.

- 8) I. Horibe, H. Nakai, T. Satoh, S. Seo, S. Takatsuto, K. Takeda, 1990. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1957 - 1967.
- 9) S. Seo, A. Uomori, K. Iwatani, Y. Nakagawa, K. Takeda, U. Sankawa, 1992. Phytochemistry: in press.
- 10) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, H. Seto, H. Nogechi, Y. Ebizuka, U. Sankawa, K. Takeda, 1990. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 105 - 109.
- 11) T. Akihisa, S. Takur, R. U. Rosenstein, T. Matsumoto, 1986. Lipids 21: 39 - 47.
- 12) T. Akihisa, P. Ghosh, S. Takur, R. U. Rosenstein, T. Matsumoto, 1986. J. Am. Oil. Chem. Soc. 63: 653 - 658.
- 13) S. Seo, A. Uomori, Y. Yoshimura, K. Takeda, H. Seto, Y. Ebizuka, H. Nogechi, U. Sankawa, 1989. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1969 - 1974.
- 14) A. Uomori, S. Seo, K. Iwatani, Y. Nakagawa, K. Takeda, U. Sankawa, submitted for publication.
- 15) unpublished data.