7. コレステリンおよびテルペンの生合成

田 村 学 造*

Biosynthesis of Cholesterol and Terpenes

Gakuzō TAMURA

I. 緒 言

近年各種の生体物質の生合成に関する研究が活発に行なわれてきているが、これらのうち天然物の中に広く分布している重要な物質の一つとしてテルペン類およびその関連物質をあげることができる。

これらはテルペノイド (terpenoid) またはイソプレノイド (isoprenoid) と呼ばれるもので、炭素 5 原子の “isoprene unit” がいくつか重合した構造を有している。その結合様式にも一定の法則性があり、“isoprene unit” が “head to tail” に結合しているものが多く、たとえばモノテルペンの β -myrcene, セスキテルペンの γ -bisabolene, ジテルペンの phytol のようなものである。さらに炭素数の多いトリテルペンやテトラテルペンにおいては、“isoprene unit” が 3 箇または 4 箇 “head to tail” に結合した C_{15} または C_{20} の単位が二つ対称に “tail to tail” に結合したスクワレン, ambreine やリコペンのようなものが多い。また環化を起こしている

ステロイドのようなものはこのほかの結合をも有しており、炭素原子の転位が認められるものもある。

ポリイソプレノイドはゴムやグッタペルカにも存在するが、前者は全部シス型に、後者は全部トランス型の配位をとっている。

このようにテルペノイドはそれを生成する生物の種類によって非常に多種類のものが存在するが、その構造に

は一定の法則性を有し、これらのものの生合成はなにか共通の素材からつくられるのではないかとことが古くから推測されていた。またこれらに由来するものとしてはビタミン A, ビタミン D や、種々のステロイドホルモンなど生理的に重要な物質を多く含んでおり、その生合成経路についての研究が活発に進められてきた。特にコレステリン生合成の研究が最も詳細に行なわれ、肝臓の切片から、これを摩砕した無細胞抽出液による生合成系の酵素学的研究が行なわれるとともに、生物的に活性な “isoprene unit” を与える物質として $C_5 \sim C_6$ の合成物を用いて生合成の前駆物質が検索されてきた。その結果 $1-^{14}C$ -酢酸, $2-^{14}C$ -酢酸を用い、これから肝臓の無細胞酵素標品でコレステリンが生合成されることが認められ、酢酸のメチル基、カルボキシル基に由来するコレステリンの炭素原子位置も証明された。したがって酢酸からコレステリンに至る生合成経路を明らかにするため、前述の $C_5 \sim C_6$ の種々の物質について検討されたが、有効な前駆物質は見出されなかった。この有効な前駆物質は意外な方面から見つけだされた。

従来多くのビタミンや必須代謝物質が微生物の生育因子として発見されてきたが、このコレステリンやカロチノイドの前駆物質も、ある種の乳酸菌の生育因子として発見されたメバロン酸 (mevalonic acid) (MVA と略す) が、その構造からみて生物的に活性な “isoprene unit” を与えるものではないかと推測され、肝臓摩砕液を用いて試験された結果、この MVA からきわめて好収量で、ほとんど理論値に近いコレステリンが、すみやかに生合成されることが明らかにされた。これを手がかりとして、酢酸から MVA の生合成経路、MVA からスクワレン、コレステリンの生合成経路が活発に研究され、それに関与する酵素も分別されて、この生合成経路の各段階が急速に解明され、ほとんど完全に明らかにされた。同時にカロチノイド、ゴムなどの他のイソプレノイドの生合成も酢酸、MVA を用いて研究され、急速に解明されてきたので、これらの生合成系について以下に述べる。またすでに公表されているコレステリンやテルペン類の生合成についての総説^{1)~8)}をも参照されたい。

II. 酢酸からコレステリンの生合成

コレステリンの生合成を無細胞の酵素標品で行なわせ

* 東京大学農学部農芸化学科 (東京都文京区向ヶ岡弥生町)
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of
Agriculture, University of Tokyo

ることが研究された結果, Bucher らによって肝臓摩砕液を用いて $1-^{14}\text{C}$ -酢酸からコレステリンが生成されることが示された⁹⁾。まず摩砕液を超遠心分離によっていくつかに分画し, どの分画がコレステリンの生成に必要なかをみると, 最初に沈殿するミトコンドリアの部分を除いてもステリンの生成は行なわれ, この分画は不要であるが, つぎに沈殿するミクロゾーム部と上澄みの可溶性酵素はともにコレステリン合成に必要なことが示された。またシアン化カリウム, 2,4-ジニトロフェノールなどミトコンドリアの呼吸能を阻害する試薬を加えてもステリン生成は阻害されない点よりもミトコンドリアが不要なことが示される。in vivo の実験においてネズミに $1-^{14}\text{C}$ -酢酸を注射し, 肝臓中の不ケン化物中への放射能のとりこみをみると, ほぼ 90% はミクロゾーム分画に含まれることが認められ, これは in vitro の実験においてミクロゾームがステリン生成に重要な役割を果しているという知見を裏付けるものである。また肝臓摩砕液により, この生成に必要な助酵素を調べ, コエンチム A (CoA), ATP (adenosin triphosphate), マグネシウムイオンおよび DPN (diphosphopyridine nucleotide) または TPN が要求されることが明らかにされた。同様に酵母による $1-^{14}\text{C}$ -酢酸からエルゴステリンの生成も静菌および無細胞酵素標品を用いて行なわれ, 肝臓標品同様細胞摩砕液の上澄みと, “small particle” 分画とが必要なが示された¹²⁾。

$^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ および $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$ より生成されるスクワレン¹⁰⁾, コレステリン¹¹⁾, エルゴステリン¹²⁾の炭素原子の由来についても詳細に研究され, 酢酸のカル

ボキシル基およびメチル基に由来する炭素原子位置が決定された。これは図-1に示すように Woodward, Bloch, Danben らによって提出されていた結合様式を証明するものである。

III. MVA の発見とこれよりスクワレン, コレステリンの生成

清酒に繁殖してこれを変敗させ, いわゆる火落の現象を起こす菌を火落菌という。火落菌には清酒だけに選択的に増殖し, 他の培養基には生育できない真性火落菌と他の通常の培養基にも生育できる火落性乳酸菌とがある。著者ら¹³⁾はこの真性火落菌, *Lact heterohiochii* および *Lact homohiochii* の未知生育因子を追求した結果, この因子は清酒には含まれるが, 肝臓エキス, 乳清, トマト汁, 麦芽などには存在しないことを認めた。ついでこの清酒中の未知因子の由来を検討した結果, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Willia*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* などの各種の微生物によって生成され, 培養液中に蓄積されることを認めた。この未知因子を *Asp olyzae* の培養口過り抽出し, 分離精製してキニン塩および *s*-benzylthiuronium 塩の結晶を得て $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4$ の分子式を有する酸であることを認め, また蒸留により得られた $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ の分子式を持つラク톤は飽和の β -オキシ- δ -ラク톤であることを示し, これを hiochic acid (火落酸) と命名した。これは合成により β -hydroxy- β -methyl- δ -valerolactone なることを認めた¹³⁾。これはほぼ同時に発見された MVA と同一のものであることが互いに認められた¹⁴⁾。

MVA は Skeggs, Wright, Folkers らによって乳酸菌の新酢酸代替因子として発見された¹⁵⁾。乳酸菌は栄養要求が複雑で, 種々のビタミンやアミノ酸を生育因子として要求するが, この研究においても種々の乳酸菌を用いて天然物中の未知生育因子の検索を行なっていたところ, *Lact acidophilus*, *Lact bulgaricus* のうちに, 合成培養基から酢酸を除去すると生育できない菌株があることを認めた。これにアルコール発酵廃液 (distille's solubles (DS)) を加えると生育するので, DS 中には微量で酢酸の代わりに利用される有効因子が含まれていることがわかる。これを向流抽出法で分別した結果, この有効因子は従来酢酸代替因子として知られていた liponic acid と違うものであることがわかり, これをさらに分離精製して, そのベンツヒドリルアミドの結晶を得, メバロン酸 (mevalonic acid MVA) と命名された。これは合成により β -hydroxy- β -methyl- δ -valerolactone と同定された¹⁵⁾。

Tavormina ら¹⁶⁾はこの MVA が従来コレステリンの生成の前駆物質として検討されていた¹⁷⁾ β -hydroxy- β -methylglutaric acid (HMG) や dimethylacrylic acid

図-1 スクワレンおよびコレステリンの炭素原子の由来

(DMA) と構造が似ており、また酢酸代替因子として有効である点に着目して、これからコレステリンの生合成の試験を行なった。ネズミの肝臓摩砕液を用いて試験した結果、MVA が酢酸よりはるかに有効な前駆体であることを認めた。また $3\text{'-}^{14}\text{C}$ -HMG, $4\text{'-}^{14}\text{C}$ -DMA, DL- $2\text{'-}^{14}\text{C}$ -MVA を用いてコレステリンへの放射能のとりこみを比較したところ、肝臓摩砕液により 37°C , 1 hr で HMG の 0.16%, DMA の 3.8%, DL-MVA の 43.4% の放射能がコレステリンに移行していることを認めた。すなわち活性型の MVA の 86.8% の放射能が短時間のうちにコレステリンにとりこまれたこととなり、これより MVA がコレステリン生合成の活性な前駆物質であることが確認され、これが生物的に活性な “isoprene unit” を与えるものであることが明らかにされた。

さらに $1\text{'-}^{14}\text{C}$ -MVA を用いて生合成を行なうと、生成したコレステリン中には放射能が認められず、この生合成過程において MVA のカルボキシル基は脱炭酸して失われることが確かめられた。また肝臓摩砕液中にスクワレンを添加してインキュベートさせると、放射能はスクワレン中に蓄積されるので、MVA からコレステリン生合成の中間にスクワレンを通ることが証明される¹⁸⁾。またネズミの腹膜中に $2\text{'-}^{14}\text{C}$ -MVA を注射すると、1 hr 後に放射能の 37% が肝臓その他のコレステリン中にとりこまれ、10% が炭酸ガスとなって放出される。4 hr 後には 50% が尿中に排出されるがこれは非天然型の異性体と思われる。すなわち *in vivo* でも MVA はコレステリン生合成の有効な前駆体であることが証明された¹⁹⁾。

MVA からコレステリン生合成の酵素系についても酢酸からの生合成と同様に検討された。ネズミの肝臓摩砕液²⁰⁾を超遠心にて分別すると、20,000 g, 60 min にて沈殿するミトコンドリアは不要であるが、20,000 g ~ 104,000 g にて沈殿するミクロゾーム部を除くとステリン合成系はスクワレン合成系よりもすみやかに失われる。この上澄み液にミクロゾームを添加すれば、ステリンの生合成能は回復する。またステリンの生合成には酸素を要し、窒素置換にてインキュベートすればスクワレンを生成し、ステリンの生成は認められない。この上澄み液を透析したものと、洗浄したミクロゾームを用いて助酵素の要求をみると、DPNH, TPNH, ATP のほか Mg とグルタチオンまたはアスコルビン酸のような還元剤を要求する。酵母の無細胞抽出液についても²¹⁾、同様に

上澄みの可溶性酵素だけでは、MVA からスクワレンのみを生成するが、その際助酵素として TPNH または DPNH, ATP, Mn または Mg が要求されることが示された。

このように無細胞酵素標品による MVA からスクワレンおよびコレステリンの生合成の条件が検討されたが、 $2\text{'-}^{14}\text{C}$ -MVA から生合成されるスクワレンおよびコレステリンの放射性炭素原子位置についても、生成したスクワレン²²⁾、コレステリン²³⁾を分離し、これを逐次分解して図-1のように決定された。これより MVA は分解されることなしに、直接 “isoprene unit” としてとりこまれることがわかる。また放射能が枝分かれしたメチル基に入らず、鎖状の炭素にのみとりこまれることは、MVA の 2 位の炭素と 5 位の炭素が結合して、縮合反応が進むことを示している。またこれによってイソプレノイド生合成における仮説を直接 C_5 の単位で証明したものと見える。

IV. MVA の生合成

MVA の発見以来この生合成経路が種々推測されていたが、これが β-hydroxy-β-methyl-glutaryl CoA (HMG CoA) より生成されることがわかり、酢酸から MVA に至る生合成経路が明らかにされた (図-2)。

Rudney, Ferguson ら²⁴⁾および Lynen²⁵⁾らは肝臓摩砕液および酵母抽出液にて acetyl CoA (AcCoA) と acetoacetyl CoA (AcAcCoA) との縮合で HMG CoA が生成することを認めた。この生成系はミクロゾーム抽出液に存在し、酢酸、アセト酢酸からの生成には、その活性化のために ATP, CoA が要求される。AcCoA と AcAcCoA の縮合酵素も精製され、この縮合反応の際、AcCoA から CoASH が放出されることが示された。またこの反応はほとんど不可逆で、HMG CoA によって阻害される。Bachhawat ら²⁶⁾は動物組織によって HMG CoA が Mg または Mn, GSH の存在で AcCoA とアセト酢酸に開裂することを証明し、Lynen らはこれら一連の反応系に対して HMG CoA サイクルを提唱した。Dekker ら²⁷⁾は動物組織、微生物によって HMG CoA がデアシラーゼ (deacylase) により HMG と CoA SH に分解することを示している。

ロイシンから HMG CoA の生成については、Dekker²⁷⁾, Mackinrey²⁸⁾, Coon²⁹⁾らは動物組織により α-ケトイソカプロン酸, isovaleryl CoA, dimethyl acryl CoA (DMACoA), β-hydroxy-isovaleryl CoA (HIV CoA) を経て、これに炭酸ガスが固定されて HMG CoA が生成することを示した。この炭酸固定反応は二酸化炭素活性化酵素によって adenylyl carboxylic acid を生じ、これが HIV CoA carboxylase により炭酸ガスを転移して HMG CoA を生成すると推定された。またこの

図-2 コレステリンの生合成経路

カルボキシラーゼにはビオチンが関与することが示された³⁰⁾。Lynen らは微生物により HIV CoA への直接の炭酸固定は起こらず、DMA CoA に炭酸固定が起こり β -methylglutaconyl CoA を形成し、これより HMG CoA が生成することを示した。これらはロイシンより HMG CoA が生成することを証明したもので、ロイシンが

カロチノイドの生合成の前駆物質として利用されるという知見と関連して興味がある。

以上の生合成系にて酢酸またはロイシンから HMG CoA が生成されることが明らかにされたが、Rudney ら³¹⁾ はこれから MVA が生成されることを示した。酵母抽出液 104,000 g の上澄みの可溶性酵素に、担体とし

て MVA を加え、基質として $1\text{-}^{14}\text{C}$ HMG CoA または $2\text{-}^{14}\text{C}$ -HMG CoA を添加してインキュベートすると、放射能は MVA の中にとりこまれることを認めた。この酵素液は透析すると活性を失うが、これに TPN, G-6-P (グルコース-6-リン酸) を添加して TPNH 再生系を働かすか、基質量の TPNH を添加すると活性は回復し、HMG CoA の 40~60% が MVA に移行する。DPN, F-6-P (フラクトース-6-リン酸) または DPNH 添加にては TPNH の 10% 以下の活性しか示さない。また HMG CoA は HMG, アセト酢酸, Ac CoA などに分解されることなしに直接 MVA に還元されることが示された。この反応は不可逆で、MVA から HMG CoA の生成は認められない。HMG CoA から MVA の生成は CoASH や AcCoA によって阻害される。 $1\text{-}^{14}\text{C}$ -HMG CoA および $2\text{-}^{14}\text{C}$ -HMG CoA から生成した MVA のラベルの位置から、HMG CoA の遊離のカルボキシル基は還元されず、チオールエステルが還元されることが示された。この還元機構については、Wright ら³²⁾ は mevaldic acid (MVLDA) が MVA の前駆物質であろうと推定しているが、この MVA 生成系に MVLDA を添加しても MVA へのラベルのとりこみはおさえられず、また MVLDA へのラベルのとりこみも認められないので、遊離の MVLDA でなく、中間体としてはチオヘミアセタールのコンプレックスの形で存在するのではないかと推定される。

Knans ら²⁰⁾ は肝臓酵素標品を用いても $1\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸から MVA が生成することを認めて、この反応にはミクロゾームと可溶性酵素の 40~80% 硫酸アンモニウム飽和沈殿部が必要で、助酵素として CoA, TPN, G-1-P, ATP, GSH および Mg を要求することを示している。

V. MVA よりスクワレンの生成

MVA がいかなる機構で縮合してスクワレンを生成するかについて多くの研究がなされた。Conferth ら³³⁾ は MVA から脱水してつくられる $\alpha\beta$, $\beta\gamma$, $\gamma\delta$ などの各種の不飽和酸を合成し、これらが MVA からスクワレン生合成の中間体になるかどうかと調べたが、すべて無効であった。Shunk³⁴⁾ らは MVA が酸化されて活性化されるのではないかと推定し、前述の MVLDA について検討したが、これも MVA よりはるかに活性の弱いものであった。また Dituri ら²⁰⁾ は farnesenic acid (FA) が MVA とスクワレンの中間体となると推定したが、FA はむしろスクワレン合成の阻害作用を有することが認められた³⁷⁾。

Tavormina ら³⁵⁾ は α -phenyl butyric acid, α -*p*-diphenylbutyric acid が $1\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸, $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA からコレステリン生成を阻害することを認めたが、著者ら³⁶⁾ は MVA のアルキル誘導体のうち、 α , β -dimethyl- β -hydroxy- δ -valerolactone, α -ethyl- β -methyl- β -hydroxy- δ -valerolactone のように α 位にメチル基、エチル基を有する類似体が MVA と拮抗的に火落菌の生育をおさえることを認めた。Woolley ら³⁸⁾ も MVA の種々の類似体についてその拮抗阻害作用を調べている。

Lynen ら³⁹⁾ は MVA が MVLDA~CoA となり、これが脱水して 5 位のアルデヒドと 2 位の活性メチレンが縮合反応を起こすのではないかと仮定したが、実際の縮合反応はこれらの推測とは異なり、つぎのような機構で起こることが明らかにされた。

Bloch ら⁴⁰⁾ は ^{14}C と ^3H とでラベルされた $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5- ^3H -MVA を用いて MVA の縮合反応の過程で酸化が起こるか否かを検討したが、生成したスクワレンと基質の MVA の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ の比が変わらないことから、MVA の δ 位の水酸基が酸化されないことを示し、したがって MVLDA や FA のような酸化生成物は中間体として存在しないことが示された。

さらに Bloch, Tchen ら⁴¹⁾ は MVA からスクワレンの生成に ATP が要求されることから、MVA のリン酸化された中間体が生ずることを推測し、酵母の可溶性酵素液を分別してこの中間体を蓄積させることにより証明した。すなわち $1\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA, $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA, ^{32}P -ATP などをたくみに用い、酵素液を硫酸アンモニウムによる沈殿法などで分別し、生成蓄積する中間体をペーパークロマトグラフィーで検索し、生成物の $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ の比をはかってその構造を推定し、さらにこれを分離して確認した。またこれらの中間体からスクワレンが生じることを確かめて、その各反応に関与する酵素を分別精製した。

この縮合機構はまず MVA が ATP, Mg の存在にて mevalonic kinase によって 5-phosphomevalonate (P-MVA) となる。ついで ATP, Mg 存在下にて P-MVA kinase によってさらにリン酸化されて、mevalonic pyrophosphate (MVA-PP) を形成する。MVA-PP は脱炭酸酵素によって 4^{isopentenyl} pyrophosphate (IP-PP) となるが、この反応にはさらに ATP, Mg を要し、この反応の中間体として MVA の β 位の水酸基もリン酸化されたものが推定される。この IP-PP が C_5 の構造を持つ生物的に活性な “isoprene unit” を与えるものであるといえる。これらのリン酸化された中間体は Lynen ら⁴²⁾ によっても同様に酵母の酵素標品を用いて分離確認された。

この IP-PP からスクワレンに至る経路も Block, Lynen らによって明らかにされた。この IP-PP は

dimethylallyl pyrophosphate (DMA-PP) isomerase によって DMA-PP に変わる。

この酵素は SH 阻害剤により阻害される。ついでこの DMA-PP と IP-PP とが synthetase により縮合して geranyl-pyrophosphate (Ger-PP) を形成する。この Ger-PP と IP-PP の 1 分子ずつより farnesyl pyrophosphate (Fal-PP) synthetase により Fal-PP が生成される。この Ger-PP, Fal-PP が C_{10} , C_{15} の中間体をなすものである。この C_{15} の unit が TPNH 関与の酵素にて “tail to tail” に縮合してスクワレンが生成される。

肝臓の酵素標品を用いても MVA からスクワレン合成の中間体が検索された。Markley, Witting⁴³⁾ らはネズミの肝臓の可溶性酵素にて、前記の酵母酵素液と同様に、P-MVA, MVA-PP, IP-PP の生成を認め、このほかにも多くの中間体をペーパークロマトで検出しており、この中の一つは farnesol なることを確認している。Popjak⁴⁴⁾ も肝臓酵素標品を用いて P-MVA より生ずる生成物をクロマトグラフ法により分割している。Ogilve⁴⁵⁾ も肝臓の可溶性酵素にて MVA より生ずる不飽和酸を分離し、その構造を決定してこれが C_{16} の分枝不飽和脂肪酸なることを示し、スクワレン生成の中間体由来する物質であろうと推定している。

このように MVA からスクワレンに至る合成経路は主として酵母標品によって解明され、MVA がピロリン酸化されて後脱炭酸し、 C_5 , C_{10} , C_{15} の unit としては、すべてピロリン酸エステルとして反応が進み、これが縮合してスクワレンが生成されることが明らかにされた (図-2)。

VI. スクワレンからコレステリンの生成

スクワレンからコレステリンの生成は MVA の発見以前から肝臓酵素により研究されスクワレンがコレステリン生合成の前駆体であることが Bloch⁴⁶⁾, Popjak⁴⁷⁾ らにより示されていた。この生合成酵素系はミクロゾーム中に存し、最初の環化生成物としてラノステリンが形成されることが推定された。Bloch⁴⁸⁾ は $1-^{14}C$ -酢酸と肝臓碎液でインキュベートすると ^{14}C ラノステリンが生成することを認め、このラノステリンの放射能は肝臓碎液によりコレステリンにとりこまれることより、これがコレステリン生合成の中間体であることを証明した。Bloch⁴⁹⁾ は肝臓碎液によるスクワレンからラノステリンの生成について $^2H-H_2O$, $^{18}O-H_2O$ および $^{18}O_2$ を用いて試験した結果、水の ^{18}O , 2H はとりこまれず、気相の $^{18}O_2$ がラノステリンにとりこまれることを認めた。またこの反応には TPNH が要求されるが、ラノステリンからコレステリンの生成系にも TPNH 再生系および O_2 が要求される。

以上のように Ruzycka⁵⁰⁾ により推定されていたスクワレンからラノステリンへの環化が証明されたが、その環化機構より、all-trans のスクワレンのみが前駆物質となりうるものが推定される。Bloch⁵¹⁾ は ^{14}C -all-trans-スクワレンを合成し、これを用いて試験したところ、生合成で得られたスクワレンと同様すみやかにラノステリンになることを認めたが、シス異性体は利用されず、不活性なることを明らかにした。

Schneider⁵²⁾ らはネズミを用いた in vivo の試験において、 $1-^{14}C$ -酢酸を注射して 10 min 後には、放射能の 1/3 はスクワレン、ラノステリンおよびその関連物質にとりこまれるが、75 min 後には放射能の大部分がコレステリンにとりこまれていることを認め、in vivo においてもラノステリンが中間体となることを証明した。Gautschi⁵³⁾ はネズミに $1-^{14}C$ -酢酸を注射し、数分後に肝臓の不ケン化物をとり、クロマトグラフィーを用いてラノステリン区分を分けると、未知物質 X_1 を得る。この X_1 物質は肝臓酵素によりコレステリンに変わる。そこで X_1 の種々の異性体を合成して比較したところ、 X_1 は $4^8,24-4,4'$ -dimethylcholestane-dien-3- β -ol (norlanosterol) と同定された。

Block⁵⁴⁾ はさらに $3\alpha-^3H$ -ラノステリン、および $3\alpha-^3H$ -norlanosterol を用い、これからコレステリンが生成される際、 3H が失われることを認めた。しかし $3\alpha-^3H$ -チモステリンを用いると 3H を失わず、また $4^8,24-4,4'$ -dimethylcholestaedien-3-one は norlanosterol と同様にコレステリンに移行することより、3位の水酸基は norlanosterol の段階でケトン型に酸化され脱メチル後再び還元されてチモステリンになると推定される。Olson⁴⁹⁾ はラノステリンからコレステリンの生成は好氣的条件下にて三つのメチル基が炭酸ガスとして放出されることを示しており、3位のオキソ基への酸化はこの酸化的脱メチル反応を効果的にすると考えられる。

チモステリンは in vivo および in vitro にてともにすみやかにコレステリンに変化することから、コレステリン生合成の直前の前駆体と考えられる⁵⁵⁾。また desmosterol もコレステリンに変化するのでチモステリンとコレステリンの間に存すると推定される⁵⁶⁾。この 24位の二重結合が還元される時期は明確には示されていないが、dihydrozymosterol が中間体か否かは不明である。

以上の知見よりスクワレンからコレステリンに至る生合成の推定経路を示せば図-2 のようである。

VII. 各種ステロイドの生合成

高等植物、カビ、酵母の重要なステリンとしてエルゴステリンがあるが、この生成系は酵母によりスクワレン、ラノステリンの生成が認められており^{7), 55), 57)}, 1-

^{14}C -酢酸に由来するエルゴステリンの炭素原子の位置も確定されている⁵²⁾。酢酸および MVA からの生合成に関与する酵素系も前述のように詳細に研究されているが、28位のメチル基はこの“isoprene rule”では説明されない。Alexander ら⁵³⁾は酵母の無細胞酵素標品で $^{14}\text{CH}_3$ -methionine のラベルが、この 28 位に最も有効にとりこまれることを認め、また ^{14}C , ^3H - CH_3 -methionine を用いて、このメチル基がそのまま transmethylation によりとりこまれることを示した。

Bloch らは ^{14}C -ギ酸のラベルもとりこまれることを認めているが、これは一度メチル基に変えられてからとりこまれるものと思われる⁵⁴⁾。しかしこのメチル基のとりこまれる段階は不明であり、チモステリンがエルゴステリンに移行しないことより、ラノステリンが生成された直後にメチル基がとりこまれるのではないかと推測される。

エルゴステリンに関連した eburicoic acid も 4 位、11 位、12 位の炭素は酢酸のカルボキシル基に由来し、21 位の炭素と 4 位についている gem のメチル基は酢酸のメチル基に由来することが示された⁵⁵⁾。また 28 位の炭素はメチオニンのメチル基に由来すると推定される。

Arigoni ら⁶⁰⁾は大豆の苗による β -シトステリンおよび soysapogenol A の生合成を研究し、酢酸よりも MVA がはるかに有効に利用されることを示した。2- ^{14}C -MVA のラベルは β -シトステリンの 1 位、7 位、15 位、22 位、26 または 27 位に入ることを読めたが、これは soysapogenol A にとりこまれたラベル位置と類似性を示し、これはトリテルペンもステリン同様スクワレンから生成されることを示すものとして興味深い。

胆汁酸がコレステリンより生成されることは Bloch らにより示され、その生成経路も Bergström ら⁶¹⁾によって示されている。またステロイドホルモンもコレステリ

ンより生成されるが、Callow, Hechter, Beyer ら⁶²⁾により示された副腎皮質ホルモンである corticosterone, cortisol などの生成経路を図-3 に示す。

VIII. カロチノイドの生合成

ステロイドの生合成機構は詳細に研究されたが、他のテルペン類についても酢酸および MVA からの生合成が確かめられた。

図-3 コレステリンより副腎皮質ホルモンの生合成経路

測されていた。これらのうちその生合成機構が最も詳細に研究されたのがコレステリンであり、酢酸より無細胞酵素液による生合成が行なわれ、ついで生物的に活性な “isoprene unit” を与える物質が、いろいろの合成品を用いて検索された。これらのうちに有効なものはみつからなかったが、ちょうどそのころ微生物の生育因子として発見された MVA が、この生合成の前駆物質であることがわかり、これが生物的に活性な “isoprene unit” を与えることが示されたので、これを手がかりと

してコレステリンの生合成機構が急速に解明をれてきた。

MVA の生合成経路としては acetyl CoA から HMG CoA を経て MVA が生成されることが明らかにされた。この HMG CoA が分枝脂肪酸からイソプレノイド生合成に向かう第一段階であり、MVA までは CoA との結合型として反応が進み、MVA に至って遊離の活性型となる。ついで MVA からスクワレンの縮合反応も、種々推測された機構とは異なり、ピロリン酸エステ

図-5 MVAより各種イソプレノイドの生成

ルとなって反応が進むことが、中間体を分離することによって証明された。すなわちこれが脱炭酸して生じる IP-PP が C_5 の活性単位であり、 C_{10} 、 C_{15} の活性型もすべてピロリン酸エステルの型で反応が進み、 C_{30} のスクワレンに至って遊離の前駆物質となる。つぎにこれが環化し、メチル基の転位、メチル基の酸化離脱を経てコレステリンに至る経路が明らかにされた。

この知見を基として carotene その他のイソプレノイドの生合成機構も次第に解明されてきたが、MVA はこれらの生合成におけるかなり普遍的な前駆物質であることが示された (図-5)。今後はさらに多くのイソプレノイドについても、その生合成機構が逐次解明されてゆくものと思われる。

これらのイソプレノイドに由来する物質の中には、多くのビタミン、助酵素、動物および植物のホルモン、アルカロイド、その他の生理活性物質が存し、これらの生合成機構の解明は生化学上最も重要な問題の一つであると思われる。

(昭和 36 年 5 月 9 日受理)

文 献

- 田村, 津田, 化学の領域, **12** (No. 6), 6 (1958)
- 田村, 蛋白質・核酸・酵素, **5** (No. 3), 141 (1960)
- 橋本, 縣, 化学の領域, **12** (No. 2), 31 (1958)
- 藤田, 化学, **14** (No. 9), 794 (1959)
- 三橋, 蛋白質・核酸・酵素, **5** (No. 9), 533 (1950)
- G. Popjak, "Ann. Rev. Biochem.", **27**, 533 (1958)
- "Biosynthesis of Terpenes and Sterols" Ed. G.E.W. Wolstenholm & M. O'Connor, Churchill London (1959)
- T.W. Goodwin, "Recent Advances in Biochemistry", p. 228 (1960)
- N.L.R. Bucher et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 498 (1953); *J. Biol. Chem.*, **222**, 1 (1956); Franz et al., *ibid.*, **206**, 471 (1954)
- L.M. Corwin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1372 (1956); J.W. Cornforth et al., *Biochem. J.*, **54**, 403 (1954)
- R.B. Woodward et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2023 (1953); W.G. Danben et al., *ibid.*, **75**, 3038, 6302 (1953); J.W. Cornforth et al., *Biochem. J.*, **53**, XXIV (1953), **54**, 597 (1953)
- D.G. Hanahan et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 867 (1952); *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 273 (1953); M.P. Klein et al., *J. Bacteriol.*, **69**, 620 (1955); **73**, 530 (1957); L.M. Corwin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **72**, 112 (1957); W.G. Danben et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2647 (1957); **81**, 403 (1959)
- 田村ら, *J. Gen. App. Microbiol.*, **2**, 431 (1956); *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.*, **21**, 202 (1957); 農化, **32**, 701, 707, 777, 783 (1958)
- G. Tamura, K. Folkers, *J. Org. Chem.*, **23**, 772 (1958)
- K. Folkers, H.R. Sheggs, L.D. Wright, D.E. Wolf et al., *J. Bacteriol.*, **72**, 1486 (1956); *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4499, 5273 (1956); *ibid.*, **79**, 1486, 2316 (1957)
- P.A. Tavormina et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498, 6210 (1956)
- K. Bloch et al., *J. Biol. Chem.*, **211**, 687 (1954); H. Rundney et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2595 (1954); *ibid.*, **77**, 1698 (1955); *Fed. Proc.*, **14**, 754 (1955); *ibid.*, **15**, 342 (1956); J.L. Rabinowitz et al., *J. Biol. Chem.*, **208**, 307 (1954); *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3037, 5168 (1954); **77**, 1295 (1955); *Fed. Proc.*, **14**, 760 (1955); F. Dituri et al., *J. Biol. Chem.*, **221**, 181 (1956)
- J.W. Cornforth et al., *Biochem. J.*, **66**, 109 (1957)
- P.G. Gorld et al., *ibid.*, **66**, 51 (1957)
- F. Dituri et al., *J. Biol. Chem.*, **229**, 825 (1957); *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2650 (1957); G. Popjak et al., *Biochem. J.*, **71**, 68, 15 (1958); **69**, 238 (1958); **70**, 19 (1958); L. Gosselin et al., *ibid.*, **71**, 660 (1959); H.G. Knauso et al., *J. Biol. Chem.*, **234**, 2835 (1959)
- B.H. Amdur, K. Bloch et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2646 (1957)
- J.W. Cornforth, G. Popjak et al., *Biochem. J.*, **69**, 148 (1958)
- O. Ister et al., *Chemica*, **11**, 167 (1957); *Helv. Chim. Acta*, **40**, 2369 (1957)
- H. Rundney, J. Ferguson et al., *Fed. Proc.*, **16**, 179 (1957); *J. Biol. Chem.*, **227**, 363 (1957); **234**, 1072, 1076 (1959); *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5580 (1957)
- F. Lynen, 生 化, **30**, 1 (1958)
- B.K. Bachhawat et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3098 (1954); *J. Biol. Chem.*, **216**, 727 (1955)
- E.E. Dekker et al., *J. Biol. Chem.*, **233**, 434 (1958); *Biochem. Biophys. Acta*, **31**, 290 (1959)
- Mackinney et al., *J. Biol. Chem.*, **234**, 598 (1959)
- B.V. Bachhawat, M.J. Coon et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1505 (1957); *J. Biol. Chem.*, **231**, 625 (1958); **233**, 520 (1958)
- B.H. Amdur et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2646 (1957)
- H. Rundney, J. Ferguson, *Fed. Proc.*, **17**, 219 (1958); **18**, 219 (1959); *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 499 (1959)
- L.D. Wright et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6572 (1957); **80**, 3485 (1958)
- G.W. Cornforth et al., *Biochem. J.*, **69**, 148 (1958)
- C.M. Shunk, K. Folkers et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3294 (1957)
- P.A. Tavormin et al., *ibid.*, **79**, 758 (1957)
- S. Tamura, G. Tamura et al., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 202 (1958)
- L.D. Wrigght et al., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **96**, 219, 364 (1957)
- D.W. Woolley et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4951 (1959)
- F. Lynen et al., *Klin. Wochshr.*, **35**, 213 (1957)
- H.C. Rilling, K. Bloch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **44**, 167 (1958); *J. Biol. Chem.*, **234**, 1424 (1959)
- T.T. Tchen, K. Bloch et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6344 (1957); *J. Biol. Chem.*, **233**, 1100 (1958); *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **44**, 998 (1958); *Fed. Proc.*, **18**, 193 (1959); *J. Biol. Chem.*, **234**, 2595 (1959)

- 42) F. Lynen *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.*, **83**, 259 (1959); *Angew. Chem.*, **70**, 738 (1958); **71**, 657 (1959); *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1254 (1959)
- 43) K. Markley *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, **31**, 287 (1959); L.A. Witting *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2841 (1959)
- 44) G. Popják *et al.*, *Biochem. J.*, **72**, 34,35 (1959)
- 45) J.W. Ogilve *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 754, 756 (1959)
- 46) K. Bloch *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **200**, 129 (1953); *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1611 (1953); *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2023 (1953)
- 47) G. Popják *et al.*, *Biochem. J.*, **58**, 403 (1954)
- 48) K. Bloch *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **218**, 305, 319 (1956)
- 49) K. Bloch *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6085 (1955); *J. Biol. Chem.*, **226**, 921, 941 (1957)
- 50) L. Ruzicka, *Experimentia*, **9**, 357 (1953)
- 51) K. Bloch *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2589 (1958)
- 52) P.B. Schneider *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **224**, 175 (1957)
- 53) F. Gautschi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 684 (1957); *J. Biol. Chem.*, **233**, 1343 (1958)
- 54) K. Bloch *et al.*, "Biosynthesis of Terpens and Sterols", p. 4 (1959)
- 55) E. Schwenk *et al.*, *Fed. Proc.*, **14**, 752 (1955); J.D. Johnston *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1145 (1957)
- 56) W.M. Stokes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **220**, 415 (1956)
- 57) B.H. Amdur *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2646, 2647 (1957)
- 58) G.J. Alexander *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2967, 4554 (1957)
- 59) W.G. Dauben *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5329 (1956); **79**, 968, 1000 (1957)
- 60) D. Arigoni, A.J. Birch, "Biosynthesis of Terpenes and Sterols", p. 231, 245 (1959)
- 61) S. Bergström *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2022 (1959)
- 62) R.K. Callon, *Ann. Reports on the Progress of Chemistry*, **53**, 305 (1957); O. Hetcher, *Fed. Proc.*, **17**, 40 (1958); "Cholesterol", p. 309 Ed. R.P. Cook, Academic Press, (1958); K.F. Beyer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **219**, 69 (1956)
- 63) E.C. Grob, *Chimica*, **10**, 73 (1956); **11**, 338 (1957)
- 64) G. Mackiney *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 598 (1959)
- 65) G.D. Braithwaite *et al.*, *Biochem. J.*, **66**, 31 (1957); *Nature*, **182**, 1304 (1958)
- 66) T.W. Goodwin *et al.*, *Biochem. J.*, **68**, 15 (1958); **70**, 612 (1958)
- 67) A.E. Purcell *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1081 (1959)
- 68) E.A. Shneour *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 770 (1959)
- 69) G.B. Baplow *et al.*, *Nature*, **182** (No. 4632), 662 (1958)
- 70) J. Bonner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **233**, 340 (1958)
- 71) V. Gloor *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 216 (1959)
- 72) A.J. Birch *et al.*, *Proc. Chem. Soc.*, 223 (1958); G.G. Britt *et al.*, *ibid.*, 224 (1958); J. Fishman *et al.*, *ibid.*, 127 (1959)
- 73) A.J. Birch *et al.*, *Proc. Chem. Soc.*, 192 (1958)

略号

CoA	: Coenzyme A
ATP	: adenosine triphosphate
DPN	: diphosphopyridine nucleotide
TPN	: triphosphopyridine nucleotide
GSH	: glutathione
G-6-P	: glucose-6-phosphate
F-6-P	: fructose-6-phosphate
CoQ	: Coenzyme Q
MVA	: mevalonic acid
MVLDA	: mevaldic acid
HMG	: β -hydroxy- β -methyl glutaric acid
DMA	: dimethylacrylic acid
FA	: farnesenic acid

8. リポタンパク質の化学

原 一 郎*

Chemical Aspects of Lipoprotein

Ichiro HARA

本特集号の最終項目としてリポタンパク質を取り上げた。リポタンパク質は本来はタンパク質の中の複合タンパク質として取り扱われていることが多かったが、近時本文にも示したGofmanのFlotation methodが発展し、脂質を多く含む比重が軽いリポタンパク質が良く取り扱われるようになってから、またリポタンパク質中の脂質がいろいろ問題に与ることが多くなってから、脂質の複合体として見るものが多くなったような感じが深い。物質種の分類というものが元来無理な線を引くことが多いから気にする必要はないと思うが、リポタンパク質は脂

質の側のものとしては脂質で取り扱いたい天然有機物質である。

本特集号のいろいろの論述にリポタンパク質がしばしば顔を出している。そういう意味を含めてリポタンパク質の概要を伝えるのが本文の目的である。

緒 言

リポタンパク質 (lipoprotein) は脂質とタンパク質の複合体であるが、その中にキョウ雑物としてか、構成成分としてか糖を含むこともある。J.Folch(1951)¹⁾はリポタ

* 東京医科歯科大学 Tokyo Medical and Dental Univ.