薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (9) 753-773 (1981)

生理活性を有する天然ステロール—特に側鎖の立体構造とその生理的意義について

池川信夫

東京工業大学理学部化学科, 〒152 東京都目黒区大岡山

Biologically Active Sterols—Stereochemistry of Sterol Side Chain and Their Biological Significance

NOBUO IKEKAWA

Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152, Japan

In the past decade, the nutrization, metabolism and function of natural sterols in animals have become an intensely investigated area of physiology and biochemistry, and direct studies toward the physiological, biochemical and chemical aspects of this problem have greatly expanded our knowledge of this area.

In this review, sterol metabolism in insects, ecdysone biosynthesis, synthesis and biological activities of vitamin D₃ metabolites (23,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcidiol lactone), stereoselective introduction of hydroxy group in the sterol side chain, synthesis of brassinolide, which have been investigated in the author's laboratory, are described, and the conformation of sterol side chain is also discussed.

Keywords—sterol metabolism in insect; vitamin D₃ metabolite; ecdysone biosynthesis; 23,25-dihydroxyvitamin D₃; 24,25-dihydroxyvitamin D₃; calcidiol lactone; brassinolide; conformation of sterol side chain; ecdysone in ovary; fucosterol; fucosterol epoxide

1. はじめに

多数の生理活性ステロイドが動植物界から単離構造決定され、更にそれらの生合成経路が明らかにされて来ると、生物はその進化の過程でイソプレンから生合成されたステロールをその生存と増殖のために如何に巧みに利用して来たかということがよくわかる。ステロールの最も大きな役割は側鎖が切断された副腎皮質ホルモン、性ホルモン等の前駆体としての役割で、これらのステロイドについては数多くの研究者によって華々しい成果が挙げられ、その結果多くの優れた医薬が開発された。ステロールはまた細胞膜の重要な構成成分であるが、最近ようやくその研究が始められ、細胞膜におけるステロールの役割についてある程度の議論が行えるようになった。

一方、これ迄主として植物中から単離構造決定されている側鎖を持った生理活性ステロイドは数群に分類することができるが、また最近いくつかの側鎖をもついわばステロールホルモンとも呼ぶことができるホルモンが発見され、側鎖の生理的意義と立体化学が新しい問題として登場して来た。我々の研究は天然ステロールに始まり、更にこのような問題を解決するために行って来たものである。

2. 天然ステロール

ステロールは動植物界に広く分布し、ある程度多量に存在するので、古来多くの研究がなされて来たが、多くの場合分離困難な類似体の混合物で、その実体を知り得なかった。1960年 Horning らによってステロイドのガスクロマトグラフィー (GC) 分析が可能になり、天然ステロールについても精密に分析することができるようになった。我々は1961年この研究に取りかかったが、当初は米国でも我々の研究室でも再現性のある充てん剤を作製することができず、試行錯誤の末、ようやくその困難を克服してステロイドのみならず、トリテルペン、アルカロイド等の GC 分析が可能になり、以来この方法は多くの分野で利用することとなった。

本総説は昭和 56 年度日本薬学会学術賞受賞業績を中心に記述したものである。

Fig. 1. Sterol Fraction in Chlorophyta *Chaetomorpha crassa* (Hosojuzumo)

1.5% SE-30, 150 cm $\times$ 4 mm i.d. 234°C.
C=cholesterol, B=brassicasterol, D=sitosterol,
A=campesterol and 24-methylenecholesterol.

我々はこのGCのテクニックをまづ海藻のステロールの分析に応用したが、¹⁾ Fig. 1 はその一例で、緑藻類ホソジュズモのステロールを分析したチャートである。²⁾ 以来 GC-MS 分析の基礎ができ、それによって以下述べるステロイドの研究に非常に役立った。恐らく GC の手段がなかったならば研究を進展させることは不可能であつたろうと思われる。

1975 年からガラスキャピラリーカラムが使えるようになり、GC の分析手段としての役割は一段と重要になった。Fig. 1 と同じステロールをキャピラリーカラムで分析したチャートが Fig. 2 であるが、分離能が非常に優れていることがよくわかるが、同時に天然のステロールは如何に複雑な混合物であることを示している。

我々の新しく発見したステロールに saringosterol,³⁾ cholesta-5,25-diene-3 β ,24-diol,⁴⁾ *E. coli* のステロール⁵⁾ などがあるが、最近先天性副腎皮質過形成症の尿中から C₂₆-ステロールである 22-*trans*-27-norcholesta-3,22-dien-3 β -ol (1)⁶⁾ を発見した。このステロールの生合成等については今後の研究に待たなければならない。

3. 昆虫におけるステロール代謝¹⁹⁾

昆虫は脊椎動物と異なり自分の体内でステロールを生合成することができず、その生長分化にステロールが必須である。一般に肉食性昆虫では cholesterol (2) を必須栄養素としているが、草食性昆虫では, sitosterol (3), stigmasterol, campesterol などの植物ステロールの C-24-アルキル基を切断して cholesterol に変換してから利用している。昆虫体内の cholesterol の一部はエクダイソンに変換されるが、大部分はそのままの形で細胞膜の重要な構成成分となっている。

昆虫における C-24 位の脱アルキル化反応については、アメリカ農務省の研究グループによるスズメガの一種 tobacco hornworm を用いた一連の研究があるが、C-24, 28 結合の切断反応のステップがどのようなメカニズムで進行するかは不明であった。

筆者らは、先にカイコにおいて ³H-sitosterol の cholesterol への変換を証明していたが、その後中断していたこの研究を次のような化学反応の発見を契機に再開することになった。すなわち, fucosterol (4) の 24,28-epoxide (5) を BF₃-etherate で処理すると、他の生成物の他に desmosterol (6) が約 35% の収率で生成する。こ

この反応は変型側鎖ステロールを合成する目的で行ったものであるが、(6) を与えることは予想していなかった。この反応は Chart 1 のようなメカニズムで進行すると考えられるが、同時にこれは昆虫における脱アルキル化の biomimetic reaction であるとみなすことができた。⁷⁾

そこで Chart 2 に示すような fucosterol epoxide を経由する生合成経路を推定し、³H ラベル体を合成して次のような実験によってそれを証明することができた。a) ³H-fucosterol の cholesterol への変換率は

Fig. 2. Sterol Fraction in *Chaetomorpha crassa*

Glass capillary column, 20 m $\times$ 0.25 i.d.,
coated with OV-17, 250°C.

Chart 1

Chart 2

10%, ^3H -fucosterol epoxide のそれは 15% であった.⁸⁾ b) 前もって epoxide を大量に経口投与したカイコに ^3H -fucosterol を投与するとその放射能の 2.5% が epoxide に移行した.⁸⁾ c) この反応が上に示すように epoxide の $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 処理の時と同様なメカニズムで進行するならば sitosterol (**3**) の C-25 位の水素は desmosterol (**6**) では C-24 位に転位しているはずである. そこで, $25\text{-}^3\text{H}$ -sitosterol を化学的に合成し, カイコに投与した後 desmosterol を単離し, その 24 位に ^3H が存在することを化学的に証明した.⁹⁾ d) 種々のステロールを含

有する合成飼料による栄養実験を行った結果, 中間体と推定されるステロール類のみが栄養要求を満たしていることが明らかになった.¹⁰⁾

更に, Chart 2 に示すような代謝阻害剤 allene-I (7), allene-II (8), および imine (9) を合成し, それらのステロール代謝阻害効果を合成飼料にステロールと阻害剤を加える方法でしらべた.¹¹⁾ その結果 allene-I (7) は 5→6→2 のステップには何ら影響がなく 3→4→5 のステップのみを特異的に阻害することがわかった. また 7 のみをステロール源とした場合, 蟻蚕が 2 令まで脱皮してそのままの状態 20 日以上も生き続けた. このことは allene-I, sitosterol, または fucosterol によってカイコの体内でのステロールのもつ構造的機能の少なくとも一部はまかなわれていることを示していた.¹²⁾ この allene-I (7) は後に Djerassi らによってスポンジから単離された.²⁰⁾

Chart 3

Allene-II (8) をステロール源と同濃度添加した合成飼料ではその生育, 脱皮が著しく抑制されるがステロール源が cholesterol でも sitosterol でも同じように抑制され, 非特異的な阻害剤であることを示唆していた. また cell free システムを用いた実験では desmosterol から cholesterol への変換を明らかに阻止していた.

Imine (9) を合成飼料に同じように添加した時にも顕著な発育阻害が見られるが, cell free の実験で特に epoxide から desmosterol へのステップを阻害していることが明らかになった.

4. Fucosterol Epoxide の立体化学

以上の結果 epoxide が脱エチル化反応の重要な中間体であることが明らかになったが, 次の問題は, 考えられる 4 種の立体異性体のいずれが真の中間体であるかということである. 24*R*, 28*R*-epoxide (5*b*) および, 24*S*, 28*S*-epoxide (5*a*) のはじめの合成は, コロンビア大学中西研究室で行われた. Fucosterol acetate を *m*-クロロ過安息香酸で酸化すると, 24,28-epoxide の混合物を与える. このものを酸で処理して glycol とし, ついで (+)- α -methoxy- α -trifluoromethylphenyl (MTPA) chloride と反応させると, 高速液体クロマト (Corasil II) で分離可能な MTPA エステルとなる. 分離した MTPA エステルをそれぞれ LiBH₄ で還元すると diol が得られ, その絶対配置を Pr(dpm)₃ を用いる CD 測定法によって決定した. この diol からそれぞれ純粋な両 epoxide を合成し, それを ³H-ラベル体に導き, 先に開発した腸管の cell-free system を用いて実験したところ, desmosterol への変換率は, 24*S*,28*S*-epoxide 37%, 24*R*,28*R*-epoxide 0.9% であった. この結果は, *S* 体が脱アルキル化反応の真の中間体であることを示していた.¹³⁾

しかし, isofucosterol もカイコの栄養要求を満たしていることなどの実験事実からこの問題を再度とりあげる必要が生じた. まず, 両 epoxide 異性体を大量に得るために fucosterol から別途 epoxide を合成し, その立体配置を化学的に既知の化合物と関連づけることによって決定しようとした. 合成ルートは, Chart 3 に示すように epoxide を経て, 24,28-diol (10) の MTPA ester をエーテルから再結晶すると一方の異性体 (10*a*) が結晶として得られる. その母液から, 他の方の異性体 (10*b*) を純粋に得ることができた. それぞれを epoxide (5*a*, 5*b*) に導き, さらに LiAlH₄-AlCl₃ で還元し, 2つの 28-alcohol (11*a*, 11*b*) が得られた. 一方, fucosterol のイソ型 (12) の hydroboration によって得た 28-alcohol (13*a*, 13*b*) を TLC で分離し, それぞれを KO₂ で反転することにより, 先に得た 28-alcohol (11*a*, 11*b*) と合致させることができた. 一方, 28-alcohol (13*a*, 13*b*) をそれぞれ clonasterol (14) および sitosterol (3) に導くことにより, 24 位の立体配置と同時に 28 位の立体配置をも決定することができた.¹⁴⁾ このようにして両 epoxide の配置が決定されたが, この結果は, 前に Pr(dpm)₃ を用いる CD 法を 24,28-glycol に適用し, それから epoxide の配置を決定した結果とは逆であった. このように, 置換基の大きさが微妙である場合には, その絶対配置を CD 法で決定することは危険であると考えられる.

このようにして疑問のない方法で合成された fucosterol epoxide (5*a*, 5*b*) を腸管の cell-free system

Fig. 3. Time Course of the Production of Desmosterol by Incubation of [3 α -³H]fucosterol Epoxide Isomers

- : (24*R*,28*R*)-epoxide plus NADPH;
- : (24*R*,28*R*)-epoxide;
- : (24*S*,28*S*)-epoxide plus NADPH;
- : (24*S*,28*S*)-epoxide.

Fig. 4. Radiochromatogram on an AgNO_3 (2%) Impregnated Silica Gel Plate of the Product obtained by Incubation of $[3\alpha\text{-}^3\text{H}]$ fucosterol in the Presence of 24,28-Iminofucosterol

Marker: (A) cholesterol benzoate; (B) fucosterol benzoate; (C) desmosterol benzoate; (D) fucosterol epoxide benzoate.

Fig. 5. HPLC Separation of the Fucosterol Epoxides (Benzoates) obtained by Incubation of $[3\alpha\text{-}^3\text{H}]$ fucosterol

Retention time of the (24*R*,28*R*)-epoxide was 17.7 min and that of the (24*S*,28*S*)-epoxide was 20.1 min. A Shimadzu-Du Pont 830 liquid chromatograph with a Zorbax SIL column was used with a solvent of hexane-methylene dichloride (1:1).

Fig. 6. Separation of (A) Fucosterol Epoxide Benzoate and Isofucosterol Epoxide Benzoate, and (B) Fucosterol Epoxide Fraction (Benzoate) from the Larva of Silkworm by HPLC (Zorbax SIL)

a, (24*R*,28*R*)-fucosterol epoxide benzoate.
b, (24*S*,28*S*)-fucosterol epoxide benzoate.
c, isofucosterol epoxide benzoate.

とインキュベートしてその desmosterol への変換率を見たところ Fig.3 に示すごとく, 24*R*, 28*R*-epoxide の方が, 24*S*, 28*S*-epoxide に比べ数倍速いことがわかった。また, fucosterol から fucosterol epoxide への変換の立体特異性を調べるために, ^3H -fucosterol をインキュベートし, 生成した sterol の benzoate 誘導体を 2% AgNO_3 TLC で分離し (Fig. 4), その epoxide benzoate fraction (D) を HPLC で調べたところ, Fig. 5 に示すごとく, ^3H -ラベルは両方の epoxide にほぼ同量分布していることがわかった。¹⁵⁾

以上述べたように fucosterol epoxide の 2 種の立体異性体 24*R*, 28*R* 体 (5b), 24*S*, 28*S* 体 (5a) は程度の差

はあるがいずれも desmosterol に変換されるし、一方 fucosterol から両方の epoxide が生成する。従ってこれらの実験結果によれば、両異性体の一方が真の中間体と結論するよりはむしろ程度に差はあるが、24*R*, 28*R* 体, 24*S*, 28*S* 体共に経過していると考えた方が妥当である。

このような結論のうら付けを得るために、また epoxide 中間体をさらに確実に証明するために、カイコの幼虫から epoxide を抽出単離しようと試みた。予備実験として幼虫の sterol fraction を LiAlH_4 で還元し、その diol fraction を TMS 化して selected ion monitoring によって 24-hydroxysitosterol の存在を確認することができた。そこで、大量のカイコ 5 令幼虫から sterol fraction を抽出し、シリカゲル-カラムで分離し、benzoate にしてシリカゲル-カラム、次いで TLC で epoxide に相当する fraction をとり、それを高速液体クロマトグラフィーで分析した結果 Fig. 6 に示すごとく 24*R*, 28*R*-epoxide が約 100 ng/larva, 24*S*, 28*S*-epoxide が約 300 ng/larva 含有していることが明らかになった。¹⁶⁾ また幼虫の sterol fraction をガラスキャピラリーカラムを用いる GLC によって分析したところ fucosterol (1.6%) と同時に isofucosterol (0.8%) も含有していることが明らかになった。以上の結果から、カイコにおける 24 位の脱エチル化反応には、厳密な立体特異性がないことが明らかになった。

Chart 4

このような我々が初めて提称した epoxide 中間体経路は Goodwin ら (チャイロコメノゴミムシダマシを用いている) および Barbier ら (バッタ) によってもそれを支持する実験が報告されており, また最近 Russo らは *Tenebrio molitor* では fucosterol epoxide の両異性体が同じように cholesterol に変換されるが, isofucosterol epoxide では 24R, 28S-epoxide が 24S, 28R-epoxide よりもよく変換されると報告している.¹⁸⁾

5. Ecdysone の生成

cholesterol が変態脱皮ホルモン ecdysone (16) の前駆体であることは古くから知られているが, その生合成器官は前胸腺であることが 1974 年によく我々によって実験的に証明された. 即ち器官培養に成功しその培養液から活性物質を抽出, 分離し, HPLC と GC-MS によって ecdysone であることを証明した. このことについては既に総説で述べた.¹⁹⁾ ¹⁴C-cholesterol を器官培養して, そのラベル体を追求して生合成中間体を捕える実験を行っているが, 中間体と思われるものの量が少なくまだ構造決定に至っていない. わずかに 3 β -hydroxy-5 α -cholestan-6-one が見つかったに過ぎない.²¹⁾ このものは多分 ecdysone への最初のステップと考えられる. しかし他の位置の酸化はどの順序で起るか, また A/B *trans* 体がどういうメカニズムで A/B *cis* 体に変換されるかは不明である. 但し合成した化合物の ecdysone への変換を *in vivo* の実験で見ることによって 25 位および 14 位の水酸基が比較的早い段階で起り, それから A/B 環が組立てられるらしいということがわかってきたことはビタミン D の場合と対比して興味あることである.

最近前胸腺のみでなく卵巣も ecdysone の分泌器官であることが明らかになった. カイコの卵巣の ecdysone について名古屋大学の西村らと共同研究を行っているが, この場合には前胸腺と異なり数種の生合成中間体と考えられるものが単離された. すなわち卵巣から 2-deoxycdysone (15)²²⁾ と 2-deoxy-20-hydroxycdysone (18)²³⁾ が単離構造決定された. これらの構造はマススペクトルから推定されたが, 最終的には Horn が植物中から単離したものと比較同定された. また新しい ecdysteroid として 2,22-bisdeoxy-20-hydroxy-ecdysone (17) を単離構造決定した.²⁴⁾ マススペクトルを詳細に検討してその構造を決定したが, 22 位に水酸基のない ecdysteroid は初めてのものである. カイコの卵の中の ecdysteroid も量比の差はあるが同じものを含有している. このように 2-deoxy 体が多いことは興味がある. また遊離型のフラクシオンも conjugate 型フラクシオンもほぼ同じような組成をもっている.

このような化合物が単離されたことからカイコの卵巣中での ecdysone の生合成は次のように考えられる. すなわち cholesterol の酸化はまず C₆, C₁₄, C₂₅ で起り, それから 2 つの経路に分れ, 一方は 22 位が酸化されて ecdysone を生成する経路と, 一方は 20 位が酸化されて 20-hydroxycdysone (19) へ行く経路である (Chart 4). Post-embryonic stage では ecdysone の 20 位の水酸化は主として脂肪組織で起り, 前胸腺では 20 位の水酸化は行われない. しかし卵巣では 20 位も 22 位も酸化を受けるのであるが, この場合は “undifferentiated type” と考えられ, それが post-embryonic stage の “differentiated type” に発達すると考えられる.

6. ビタミン D の代謝

この 10 年間にビタミン D の代謝と作用機序についての研究は急速に進歩した. すなわち Wisconsin 大学の DeLuca の研究グループによって活性代謝物が単離構造決定され, それらの内分泌系が解明された. それによればビタミン D₃ (20) はまず肝臓で 25 位が水酸化される. この 25-OH-D₃ (21) は D₃ の血液中を循環する主代謝物であるが, それが腎臓に運ばれて, その生理的条件によって, さらに 1 α ,25-(OH)₂D₃ (22) または 24,25-(OH)₂D₃ (23) に酸化されるが, D₃ の生理活性の発現には 1 α 位の水酸化が必須の条件である. 腎で 25,26-(OH)₂D₃ (24) も出来るが, 24,25-(OH)₂D₃ は更に 1,24,25-(OH)₃D₃ (25) に代謝される (Chart 5). Ca の動的平衡メカニズムは Fig. 7 に示すが, これらについては既に著者の総説²⁵⁾ 等に多く述べられているのでここでは省略することにする.

著者の研究室でビタミン D の研究に着手したのは 1972 年で, 当時海藻から抽出した fucosterol をやや多量に持っていたので, それを合成原料として側鎖に水酸基をもつ代謝物の合成に好都合であった. 当時 21,25-(OH)₂D₃ と発表されていたものは 24,25-(OH)₂D₃ の間違いらしいという情報を得たのでまず 24,25-(OH)₂D₃ および 24-OH-D₃ の合成から着手した.

Fucosterol から得た 24-ol 体 (30) および desmosterol から得た 24,25-diol 体 (31) をそれぞれシリカゲルカラムで分離し, 2 種の異性体を得, 24 位の配置は, GLC による Horeau の変法によって決定した.³³⁾ かくして

Chart 5

Chart 6 に示すように、当時単離されていた代謝物すべての合成ができた。²⁵⁾

先に述べたように活性発現に 1 位の水酸化は必須であるが、24 位の水酸化はどのような意味をもつか甚だ興味ある問題であった。この点について数年来 DeLuca のグループと共同研究を行ない、以下のように 24 位水酸化の問題を明らかにすることができた。

7. ビタミン D の 24 位の水酸化

7-1. 24,25-(OH)₂-D₃ の 24 位の配置の決定 DeLuca らの単離した 24,25-(OH)₂-D₃ の 24 位の立体配置は不明であったので、まずこれを明らかにすることとした。生体で作られるものは非常に微量であるため、単離したものと直接スペクトルを比較して *R* か *S* を決定することは不可能であった。止むを得ず、クロマトグラフィー上の保持時間で比較することとした。TMSi 体の GLC ではもちろん *R* と *S* は分離できず、また遊離型

Fig. 7. Diagrammatic Sketch of the Calcium Homeostatic Mechanisms involving the Vitamin D Endocrine System

ように放射能は $24R$ のピークのみに検知された。また、 $24R$ 体は、腸管における Ca 輸送作用、血清リン酸濃度の上昇作用、クル病ラットにおける骨の石灰化作用において $25-OH-D_3$ と同程度の活性があり、生体内から単離された $24, 25-(OH)_2-D_3$ とまったく同様の生理活性を示した。これに反し、 $24S$ 体には腸管の Ca 輸送作用以外はほとんど生理活性のないことがわかった。このようにして、 $24, 25-(OH)_2-D_3$ の 24 位の配置は R と確定することができた。²⁶⁾

Fig. 8. Separation of the Tris-trimethylsilyl Ether Derivatives of $24S, 25-(OH)_2 D_3$ and $24R, 25-(OH)_2 D_3$ and Cochromatography of the Tris-trimethylsilyl Ether Derivative of radioactively Labeled, biologically Generated $24, 25-(OH)_2 D_3$ with the $24R, 25-(OH)_2 D_3$ Derivative

—, optical density at 254 nm; the clear bars represent radioactivity in each fraction.

では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離できなかったが、TMSi 体が HPLC で分離できることを見つけたので、²⁶⁾ 生体から得られたラベル体との cochromatography を行ったところ、Fig. 8 に示す

7-2. 24*R* 体と 24*S* 体の生理活性の相違 24, 25-(OH)₂-D₃ と同様に合成した [24*R*]-24-OH-D₃ と [24*S*]-24-OH-D₃ は共に D 欠ラットの腸管の Ca 輸送作用をもつが、この作用は腎摘出ラットではみられないことから、D₃ の生理作用発現のために 1α 水酸化が必要であることがよくわかる。しかし、Table I に示すように、骨からの Ca の溶出作用および骨の石灰化作用は 24*S* 体にはみられないが、24*R* 体には 25-OH-D₃ と同程度の活性がみられる。²⁷⁾ この差異は何に起因するかを検討するために、[24-³H]-24-OH-D₃ の 24*R* および 24*S* 体を合成して、その代謝を調べることにした。²⁸⁾

TABLE I. Biological Activity of 24-Hydroxyvitamin D₃ Compounds in Rats

Compound	Activity (units/μg)		
	Calcium transport in intestine	Mobilization of bone Ca ²⁺	Calcification
Vitamin D ₃	40	40	40
25-OH-D ₃	150	150	150
(24 <i>R</i>)-24-OH-D ₃	150	150	150
(24 <i>S</i>)-24-OH-D ₃	120	<1	<1
(24 <i>R</i>)-24,25-(OH) ₂ D ₃	140	140	140
(24 <i>S</i>)-24,25-(OH) ₂ D ₃	120	<1	<1

Log dose curves were determined for each compound in each system. Graded doses of each were given daily for 7 days. The parameters were measured 9 hours after the last dose. The activity of vitamin D₃ was arbitrarily set at 40 units/μg and was used as a basis for calculation of units of activity for the other compounds.

Fig. 9. Metabolites of (24*R*)- and (24*S*)- 24-OH-[24-³H]D₃ in Serum and Bone of Rats

Serum or femurs from rats were extracted in methanol-chloroform and chromatographed using Sephadex LH-20 columns.

クル病ラットにおける血清および骨での代謝物を Sephadex LH-20 のカラムで分離したクロマトグラムを Fig. 9 に示す. いずれの場合も主代謝物は $24, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ であるが, $24 R$ 体のみ相当量の $1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ の代謝物がみられ, $24 S$ 体ではみられない. 腎臓, 肝臓, 小腸粘膜における代謝物の分析, 血清中の代謝物の経時変化を調べたところ, $24 R$ 体と $24 S$ 体では C-25 位の水酸化には差はないが, 1α 水酸化には著しい差があり, $[24 R]\text{-}24, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ではさらに 1α 水酸化が起こり, これが活性の差として表われる. 結論として, $24 R$ と $24 S$ に対する区別は, 1α -hydroxylase が働くか否かの段階にあることは明らかである. このことは, 化学的に合成された $[24 S]\text{-}1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ と $[24 R]\text{-}1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ では活性に大差ない³⁰⁾ ことからもうなずける.

腸管での Ca 輸送作用は, $24 R$ と $24 S$ とで大差ない. これは, $24 S$ 体でもわずかながら 1α 水酸化が起こり, それがこの作用の発現に十分な量であるためと考えられる. 石灰化作用などにはより多量が必要とするわけである.

7-3. $1, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ の 24 位水酸化 これまでに発見されている最も極性の高い化合物 $1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ は正常な代謝産物であるか否か, またその生理的意義は何であるか不明であった. そこで, その生成を *in vivo* および *in vitro* の系で詳しく調べることにした.²⁹⁾ ラベルした 25-OH-D_3 , $1, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$, $1\alpha\text{-OH-D}_3$, 24-OH-D_3 を高 Ca 低リン酸飼料で飼育したラットに投与して, その代謝を調べたところ, いずれも相当量の $1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ に変換されていることがわかった. 低 Ca, 正常リン酸食で飼育したラットでも同様であった. したがって, D_3 は, 25-OH-D_3 から $1, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ になり, それが 24-hydroxylase を誘導して $1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ に代謝されると考えられ, このものが生理的条件下での代謝物であることはほとんど疑いない. また, ここに生成されたものは化学的合成品との *cochromatography* により, $[24 R]\text{-}1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ であることも証明された.

24-Hydroxylase は腎のみにあり, 腎摘出動物では $1, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ の 24 位水酸化は起らないと考えられていたが, 実際に腎摘出動物でも $1, 24, 25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$ が生成されることがわかったので, 24-hydroxylase は腎以外

Fig. 10. Metabolites produced by the *in Vitro* Incubation of Chick Mitochondria with Radioactive Vitamin D_3 Compounds

にも存在することが明らかになった。

トリの腎ミトコンドリアについての実験によれば、25-OH-D₃ を 24, 25-(OH)₂-D₃ に変換する酵素は同時に 1, 25-(OH)₂-D₃ をも 25-水酸化すること、また 25-OH-D₃ の 1-hydroxylase は 24, 25-(OH)₂-D₃ をも 1-水酸化する。しかし、興味あることに、同じ実験で、Fig. 10 に示すように 1 α -OH-D₃ は 24-hydroxylase によって 1, 24-(OH)₂-D₃ にならないし、また 24-OH-D₃ には 1-hydroxylase が働かない。すなわち、腎で 24-hydroxylase および 1-hydroxylase が働くためには、25 位に水酸基が存在することが必須の条件であることが明らかになった。

8. ビタミン D の 26 位および 23 位の水酸化

25, 26-(OH)₂-D₃ (24) の 25 位の配置については Redel らは初め 25 *R* であると報告したが、後に *S* 体と訂正した。最近 Roche のグループが別途 25, 26-(OH)₂-D₃ の *R* 体と *S* 体を合成し、天然のものは *S* と決定している。³¹⁾ 25, 26-(OH)₂-D₃ の 25 位の配置の決定は疑問のない方法で純粋な (25*R*) および (25*S*) の両異性体を合成する必要がある。そのために我々は Chart 7 に示すような 24 位のカルボニルの不斉還元を用いた。種々の不斉還元を検討した結果、野依らの開発した 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl、と LiAlH₄ と EtOH の complex が優れていることがわかった。24-アルデヒドのグリニア反応で 25-en-24-ol (34) を得、それを酸化して 35 を得た。35

Chart 7

を(R)-(+)-の complex で還元すると 95% の optical yield で 24 R の 36 が得られ, (S)-(-) の試薬を使うと 24 S の 37 が得られた. これらを *t*-BuOOH-VO (acetylacetonate)₂ で epoxidation すると, 36 からは 38, 37 からは 39 が得られた. それぞれ K₂CO₃ で処理して 40 および 41 を好収率で得ることができた. これらのエポキシアルコールから, (25 S) (44), および (25 R)-25,26-dihydroxycholesterol (45) を得ることができた. また先に混合物の分離によって得た 24,25-diol の異性体 (42, 43) を立体特異的に得ることができた.³²⁾ これらを D₃ 型に導いて 24 を合成した. R と S の両者は MTPA エステルがよく分離できることがわかったので目下天然品との同定を行っている.

最近 DeLuca のグループは新しい代謝物として Chart 5 に示すように 23-カルボン酸および 24-カルボン酸を単離しているが, これらの生理活性は弱い.³⁴⁾

DeLuca らはまた側鎖にラク톤を有する calcidiol lactone (25-OH-D₃-26,23-lactone) (29)³⁵⁾ と 23,25-(OH)₂-D₃ (28)³⁶⁾ を発見しており, 23 位の水酸化された化合物が初めて単離された. 我々は早速これらの配置を決定すべくそれらの異性体を合成した.

23,25-(OH)₂-D₃ は Chart 8 に示すようなルートで 25-en-23-ol (48) を合成しその dibenzoate を再結晶, 次に TLC によって分離し, oxymercuration によって 25 位に水酸基を導入して 2 つの異性体 49a, 49b を得ることができた. 23 位の配置の決定は X 線解析によって more polar なエピマー (49a) を 23 S と決定できたので, less polar な 49b は 23 R である. それぞれを D₃ 型に導き (23 S)-23,25-(OH)₂-D₃ (50a) および (23 R)-23,25-(OH)₂-D₃ (50b) を合成できた. これらと天然物との cochromatography によって 23 S と決定した.³⁷⁾

Calcidiol lactone の 4 種の異性体の合成は次のようにして行った. 22-アルデヒド (33) から得られた 22,23-trans-26-カルボン酸 51 の iodolactonization によって 26,23-lactone (52) を合成し, それを MoOPH (MoO₅·Py·HMPA) で酸化したところ, 1 種類の 25-hydroxylactone (53) が得られた. 一方 51 のエチルエステルを予め酸

Chart 8

化し 54 に導いてからラクトン化すると 2 種の 25-hydroxylactone が得られ、一方は 53 と一致する。52 ($R=I$) を 22,23-epoxide とし、それを還元して得られた 22-ol および 23-ol を 22 (または 23)-hydroxycholesterol に導くことによって 53 の 23 位は R と決定できた。³⁸⁾ MoOPH は less hinder side attack と考えられるので 53 は 23 R , 25 R と推定されるが、事実 53 を 25,26-dihydroxycholesterol (45) に導くことによって確認した。従って 56 は 23 R , 25 S と考えられる。

23 S の lactone は 22,23-*cis*-26-acid (57) より合成した。この *cis*-acid は α -methylbutyrolactone から得た ylid との Wittig 反応によって得られた。前と同様に 57 のラクトン化、次いで酸化により 25-hydroxylactone 59 が得られた。一方 25-hydroxy-26-acid (60) の selenolactonization によって 2 つの hydroxylactone 59 およ

Chart 9

び **62** が得られた. この 23 位の配置は 23,25-dihydroxycholesterol (**49a**) に導くことによって *S* と決定できたので, **59** は 23*S*, 25*S*, **62** は 23*S*, 25*R* であることが確定された. このようにして 4 種の 25-hydroxylactone を純粋に得ることができたので, それぞれを 5,7-diene に導き, それらの光反応によって 4 種の lactone A, B, C, D を合成することができた. これらは HPLC でよく分離でき A, B, C, D の順に溶出される. DeLuca の研究室で得られた ^3H 体との co-chromatography によって生体から得られたものは 23*S*, 25*R* (lactone C) と一致し, 23 位の配置は先に得られた 23,25-dihydroxyvitamin D_3 と同じである.

Calcidiol lactone は 25,26-(OH) $_2$ - D_3 から生合成されるということが報告⁴⁰⁾されたが, 23,25- および 25,26-(OH) $_2$ - D_3 の腎ホモジネートとのインキュベーションによって 23,25-(OH) $_2$ - D_3 が calcidiol lactone の precursor であることが田中らによって証明された.⁴¹⁾

9. 活性型ビタミン D のアナログの合成

新しいホルモンが発見されるとその合成研究と同時に, より活性の強いものの合成あるいは作用の分離のためにまた構造-活性相関を明らかにするために, 種々のアナログの合成研究が行われている. 我々は東京薬大小林研究室と共同で種々のフッ素誘導体を合成した. それは deactivation と考えられる水酸基の導入位置をフッ素でブロックすることと, フッ素導入によりその近傍の水酸基を activation することを目的とした. 24,24- F_2 -25-OH 体 (**63**),⁴²⁾ 24-F-25-OH 体 (**65**)⁴²⁾, 24,24- F_2 -1,25-(OH) $_2$ - D_3 (**64**),⁴³⁾ 26,26,26,27,27,27- F_6 -25-OH- D_3 (**66**)⁴⁵⁾ 2 β -F-1 α -OH- D_3 (**67**)⁴⁴⁾ 等を合成した. いずれもフッ素を持たない化合物よりも活性が強く, 特に **64** の Ca-binding protein を induce する作用は 1,25-(OH) $_2$ - D_3 の 4—5 倍である.⁴⁷⁾更に詳細なテストが DeLuca の研究室で行われている.⁴⁶⁾

先に 24 位の水酸基の配置によって活性が異なることを述べたが, そのことは 24 位の水酸基が何らかの重要な意味をもつに違いないと考えて合成したのが, 1,24-(OH) $_2$ - D_3 (**68**) である.⁴⁸⁾ この場合の 24 位の水酸基は明らかに, 1,25-(OH) $_2$ - D_3 の 25 位の水酸基の代わりの役割を持っており, たいへん興味深い生理活性を示し,⁴⁹⁾ 目下臨床テストが行われている.

Chart 10

1 α -OH-D₃ および 1,25-(OH)₂-D₃ は腎臓透析患者の骨代謝異常症の治療薬となっており, また骨粗鬆症の治療薬として期待されている. 生化学的基礎研究が実際に役立った好例といえる.

10. ステロール側鎖のコンホメーションと生理活性ステロイドの合成

これ迄側鎖の立体選択的合成についての組織的研究はほとんど行われていないし, また側鎖のコンホメーションについて全く論じられていなかった. 側鎖を持つ生理活性ステロイドの合成にはまづ側鎖の化学反応における試薬の攻撃方向を解明しなければならない. 我々の研究室ではまづステロールの 22 位の二重結合の反応性と試薬の攻撃方向を検討した.⁵⁰⁾ 22 位に *R* または *S* の水酸基をもつ側鎖の合成は, 22,23-epoxide の Grignard 反応によって立体選択的に導入できることがわかった.⁵¹⁾ 従って 22,23-epoxide を立体選択的に合成することによ

Chart 11

Chart 12

て側鎖の組立ができる。⁵²⁾ このような検討のもとに海産ステロールの代表的なものの一つである demethylgorgosterol (69) の合成を完成し,⁵³⁾ また抗がん活性ステロイド withaferin A (70) の合成を行っている。

最近アメリカのグループがセイヨウアブラナ *Brassica rapus* L. の花粉から新しい植物成長促進物質 brassinolide (71) を単離構造決定した。これは初めて発見されたステロイド系植物ホルモンでその側鎖は 22*R*, 23*R*, 24*S* 配置をもっている。この合成は、我々とアメリカのグループによってほぼ同時に完成された。我々は Chart 12 に示すような方法によった。⁵⁴⁾ 22-アルデヒドに 3-methylbut-1-ynyl-Li を反応させ 72 と 73 の混合物を得、72 を Lindlar によって還元して *cis*-allylic alcohol (74) とし、Sharpless の epoxidation で 75 とした。この 24 位に直接メチル基を導入しようとしたが成功しなかったため hydrocyanation によって 77 とし、それを *iso*-Bu₂AlH で還元してアルデヒドとし、それを常法によって 24-メチル基に導いた。A/B 環の組立ては mesylate (80) の hydroboration, 次いで PCC 酸化と LiBr 処理によって 4²-6-ketone (81) とし、その OsO₄ 酸化で 82 を合成した。この tetraacetate の trifluoroacetic acid による Baeyer-Villiger oxidation, 次いで酸によるけん化によって 71 を合成した。合成品のマススペクトルおよび ¹³C-NM R は天然品と全く同一であった。また 22 位の *cis* および *trans* の二重結合に対する OsO₄ を検討し、28-norbrassinolide を合成することができた。⁵⁵⁾ この brassinolide 類は auxin 活性を持つと共に lamina assay において非常に強い活性を示し、⁵⁶⁾ その植物中での生理的意義の究明および農学での利用に非常に興味をもたれている。

ecdysteroid, antheridiol, withaferin A 等 22 位に水酸基をもつこれら天然物は、brassinolide をのぞきすべて 22*R* 配置である。22*R* の置換体は 16 位のメチレンとの 1,3-interaction によって恐らく 85 のようなコンホメーションを取っていると考えられる。このことは ecdydione の X 線解析によっても示唆されているが、22-水

Chart 13

酸基異性体等の NMR の詳細な検討により 22S は 84, 22R は 85 のような異なるコンホメーションを持っていることが明らかになった.⁵⁷⁾

我々は cholesterol 側鎖の pregnenolone への切断反応への機構についても、その立体化学的考察を行ったが、⁵⁸⁾ その中間体である 22-ol および 20,22-diol の 22 位水酸基も R 配置である。X 線解析の結果は cholesterol 側鎖は 87 のように伸びていることを示しているが、もし enzyme が上から近づいて側鎖が折れ曲るとすると 22-pro R の H が酸化されるのに丁度都合のよい方向に立つと考えられる。

先にビタミン D の水酸化は 24 位においては R, 23 位においては S 配置に起ることを述べたが、側鎖の考えられるコンホメーションを brassinolide の場合と比較すると 89 および 90 に示すごとくいずれの場合も back side から酸化（およびアルキル化）を受けていることがわかる。

さて側鎖を持ったステロイドホルモンはこれまで述べて来た ecdysone, 1,25-(OH)₂-D₃, brassinolide の外に水かびの性ホルモン antheridiol と oogoniol があるに過ぎない。これらの側鎖の生理的意義を考察することはなはだ興味がある。我々の研究室で行っている ecdysone の生合成と vitamin D₃ の代謝を比較すると、一方は昆虫および甲殻類の脱皮ホルモンでクチクラの様な硬化蛋白の合成へと導くホルモンであり、一方は脊椎動物の骨を形成するホルモンである。その生合成過程は共に先に 25 位が酸化されその水酸基を利用して A/B 環を組立てており、化学的にもいくつかの類似点がある。

11. おわりに

以上の研究成果は森崎益雄博士を中心とした次の諸氏の熱心な実験によって得られたものであり、ここに記して深く感謝する次第である。平山和雄、春山敏夫、栗田則男、大高 博、関 雅夫、石黒正路、中根正己、坂下啓一、藤本善徳、竹下 徹、加藤喜規、雑賀昭助、桜井 勝、梶川 明、坂内 清、小泉直之、赤岩 明、斎藤博満、坂本敦男、佐藤 晋、村上和夫、石川剛章、押田淳一、鷹巣彰弘、菊池康夫、J. Rubio, I. Chardon, C. Duque, 平野 豊、木戸岡佐季子、井坂容子、平山匡男、今村信孝、池田隆文、応 百平、高津戸秀、江口 正、安田光廣、宮坂 悟、松居正己、本間 靖、綿貫礼子の諸氏。なおビタミン D については Wisconsin 大 H.F. DeLuca, 田中洋子両博士、昆虫ホルモンについては名大・大西英爾、北大・茅野春雄両博士等との共同研究によった。研究費は文部省科研費、日本学術振興会、新技術開発事業団等の援助によった。併せて深謝する次第である。

引用文献および注

- 1) K. Tsuda, K. Sakai, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 835 (1961).
- 2) N. Ikekawa, N. Morisaki, K. Tsuda, T. Yoshida, *Steroids*, **12**, 41 (1968).
- 3) N. Ikekawa, K. Tsuda, N. Morisaki, *Chem. Ind.*, **1966**, 1179.
- 4) I. Chardon-Loriaux, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Phytochem.*, **15**, 723 (1976); M. Morisaki, S. Kidooka, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 3214 (1976).
- 5) K. Schubert, G. Rose, R. Tummler, N. Ikekawa, *Zeit. Physiol. Chem.*, **339**, 293 (1964).
- 6) N. Ikekawa, Y. Fujimoto, M. Ishiguro, S. Suwa, Y. Hirayama, H. Mizunuma, *Proc. Japan Academy*, **55**, 252 (1979); N. Ikekawa, Y. Fujimoto, M. Ishiguro, S. Suwa, Y. Hirayama, H. Mizunuma, *Science*, **204**, 1223 (1979).
- 7) N. Ikekawa, M. Morisaki, H. Ohtaka, Y. Chiyoda, *Chem. Commun.*, **1971**, 1498; *idemx*, *J. Org. Chem.*, **38**, 1688 (1973).
- 8) M. Morisaki, H. Ohtaka, M. Okubayashi, N. Ikekawa, *Chem. Commun.*, **1972**, 1275.

- 9) Y. Fujimoto, N. Awata, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 4335.
- 10) M. Morisaki, H. Ohtaka, N. Awata, N. Ikekawa, Y. Horie, S. Nakasone, *Steroids*, **24**, 165 (1974).
- 11) Y. Fujimoto, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Steroids*, **24**, 367 (1974); N. Awata, M. Morisaki, Y. Fujimoto, N. Ikekawa, *J. Insects Physiol.*, **22**, 403 (1976).
- 12) M. Morisaki, N. Awata, Y. Fujimoto, N. Ikekawa, *Chem. Commun.*, **1975**, 362.
- 13) S.-M.L. Chen, K. Nakanishi, N. Awata, M. Morisaki, N. Ikekawa, Y. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 5297 (1975).
- 14) Y. Fujimoto, K. Murakami, N. Ikekawa, *J. Org. Chem.*, **45**, 566 (1980).
- 15) Y. Fujimoto, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Biochemistry*, **19**, 1065 (1980).
- 16) N. Ikekawa, Y. Fujimoto, A. Takasu, M. Morisaki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 709.
- 17) M. Morisaki, B. Ying, N. Ikekawa, *Experientia*, **37**, 336 (1981).
- 18) F. Nicotra, P. Pizzi, F. Ronchetti, G. Russo, L. Toma, *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1981**, 480; *idemx, Chem. Commun.*, **1980**, 479.
- 19) 池川信夫, 森崎益雄, 化学と生物, **15**, 13 (1977).
- 20) N. Theobald, J.N. Shoolery, C. Djerassi, T.R. Erdman, P.J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5574 (1978).
- 21) S. Sakurai, N. Ikekawa, T. Ohtaki, H. Chino, *Science*, **198**, 627 (1977).
- 22) E. Ohnishi, T. Mizuno, F. Chatani, N. Ikekawa, S. Sakurai, *Science*, **197**, 66 (1977).
- 23) E. Ohnishi, T. Mizuno, N. Ikekawa, T. Ikeda, *Insect Biochem.*, **11**, 155 (1981).
- 24) N. Ikekawa, T. Ikeda, T. Mizuno, E. Ohnishi, S. Sakurai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 448.
- 25) 池川信夫, 化学と生物, **16**, 287 (1978).
- 26) Y. Tanaka, H.F. DeLuca, N. Ikekawa, M. Morisaki, N. Koizumi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 620 (1975).
- 27) N. Ikekawa, M. Morisaki, N. Koizumi, M. Sawamura, Y. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 485 (1975); Y. Tanaka, H. Frank, H.F. De Luca, N. Koizumi, N. Ikekawa, *Biochemistry*, **14**, 3293 (1975).
- 28) Y. Tanaka, H.F. DeLuca, A. Akaiwa, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 615 (1976).
- 29) Y. Tanaka, L. Castillo, H.F. DeLuca, N. Ikekawa, *J. Biol. Chem.*, **252**, 1421 (1977).
- 30) L. Castillo, Y. Tanaka, H.F. DeLuca, N. Ikekawa, *Mineral and Electrolyte Metabolism*, **1**, 198 (1978).
- 31) J. J. Partridge, S. Shiuey, N. K., Chadha, E. G. Baggiolini, J. F. Blount, M. R. Uskokovic, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1253 (1981); R. Barner, J. Hiibschler, J.J. Daly, P. schönholzer, *Helv. Chem. Acta*, **64**, 915 (1981).
- 32) M. Ishiguro, N. Koizumi, M. Yasuda, N. Ikekawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 115.
- 33) M. Seki, N. Koizumi, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 15; N. Koizumi, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 2203.
- 34) N. Koizumi, M. Morisaki, N. Ikekawa, Y. Tanaka, H.F. DeLuca, *J. Steroid Biochem.*, **10**, 261 (1979).
- 35) J.K. Wichmann, H.F. DeLuca, H.K. Schnoes, R.L. Horst, R.M. Shepard, N. A. Jorgensen *Biochemistry*, **22**, 4755 (1979).
- 36) Y. Tanaka, J.K. Wichmann, H.K. Schnoes, H.F. DeLuca, *Biochemistry*, in press.
- 37) N. Ikekawa, T. Eguchi, Y. Hirano, Y. Tanaka, H.F. DeLuca, A. Itai, Y. Iitaka, *Chem. Commun.*, in press.
- 38) N. Ikekawa, Y. Hirano, M. Ishiguro, J. Oshida, T. Eguchi, S. Miyasaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2852 (1980).
- 39) T. Eguchi, S. Takatsuto, M. Ishiguro, N. Ikekawa, Y. Tanaka, H.F. DeLuca, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, in press.
- 40) B.W. Hollis, B.A. Roos, P.W. Lambert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 520 (1980).
- 41) Y. Tanaka, H.F. DeLuca, H.K. Schnoes, N. Ikekawa, T. Eguchi, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, in press.
- 42) Y. Kobayashi, T. Taguchi, T. Terada, J. Oshida, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2023 (1979).
- 43) Y. Tanaka, H.F. DeLuca, H.K. Schnoes, N. Ikekawa, Y. Kobayashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**,

- 473 (1980).
- 44) J. Oshida, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1775 (1980).
- 45) Y. Kobayashi, T. Taguchi, N. Kanuma, N. Ikekawa, J. Oshida, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, 459.
- 46) Y. Tanaka, H.F. DeLuca, Y. Kobayashi, T. Taguchi, N. Ikekawa, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7163 (1979).
- 47) R.A. Corradino, H.F. DeLuca, Y. Tanaka, N. Ikekawa, Y. Kobayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1800 (1980); R.A. Corradino, N. Ikekawa, H.F. DeLuca, *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 273 (1981).
- 48) N. Ikekawa, M. Morisaki, N. Koizumi, T. Takeshita, N. Ishimoto, *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1975**, 1421.
- 49) H. Kawashima, K. Hoshina, Y. Hashimoto, T. Takeshita, S. Ishimoto, T. Noguchi, N. Ikekawa, M. Morisaki, H. Orimo, *FEBS Letters*, **76**, 177 (1977).
- 50) M. Nakane, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Tetrahedron*, **31**, 2755 (1975).
- 51) M. Ishiguro, H. Saito, A. Sakamoto, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3715 (1978).
- 52) M. Ishiguro, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2860 (1975).
- 53) M. Ishiguro, A. Akaiwa, Y. Fujimoto, S. Sato, N. Ikekawa, *Tetrahedron Lett.*, **9**, 763 (1979); S. Sato, A. Akaiwa, Y. Fujimoto, M. Ishiguro, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 406 (1981).
- 54) M. Ishiguro, S. Takatsuto, M. Morisaki, N. Ikekawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, 962.
- 55) S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 903 (1981).
- 56) K. Wada, S. Marumo, N. Ikekawa, K. Mori, *Plant and Cell Physiol.*, **22**, 323 (1981).
- 57) M. Nakane, N. Ikekawa, *J. Chem. Soc.*, **1977**, 1426.
- 58) M. Morisaki, C. Duque, N. Ikekawa, M. Shikita, *FEBS Letters*, **72**, 337 (1976); *idem*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 179 (1978); *idem*, *ibid.*, **85**, 317 (1978); *idem*, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4479 (1979); *J. Steroid Biochem.*, **13**, 545 (1980).