植物ステロール側鎖の生合成機構の精密解析

藤本 善徳,^{*,a} 森崎 益雄,^b 池川 信夫^c東京工業大学大学院理工学研究科,^a 〒152-8551 目黒区大岡山 2-12-1共立薬科大学,^b 〒105-8512 港区芝公園 1-5-30新潟薬科大学,^c 〒950-2076 新潟市上新栄町 5-13-2

Studies on the Biosynthesis of Sterol Side Chain in Higher Plants

Yoshinori FUJIMOTO,^{*,a} Masuo MORISAKI,^b and Nobuo IKEKAWA^cDepartment of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology,^a 2-12-1, O-okayama,Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan, Kyoritsu College of Pharmacy,^b 1-5-30, Shibakoen,Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan and Niigata College of Pharmacy,^c 5-13-2,

Kamishinei-cho, Niigata 950-2076, Japan

(Received July 3, 2000)

Campesterol (**3**) and dihydrobrassicasterol (**4**), typical C₂₈-sterols in higher plants, are biosynthesized from a steroidal 24-ene precursor (desmosterol **1**) via 24-methylenecholesterol (**2**) and 24-methyl-desmosterol (**5**). A typical plant C₂₉-sterol, sitosterol (**6**), is produced from 24-methylenecholesterol via isofucosterol (**7**) and 24-ethyl-desmosterol (**8**). The biosynthetic mechanism, focussing stereochemical features, of these side-chain transformations has been studied in detail by feeding regio- and stereoselectively ¹³C- or ²H-labeled steroidal substrates to cell cultures of higher plants such as *Oryza sativa*, *Catharanthus roseus* and *Morus alba*. These studies allowed to correlate the metabolic origin of C-26 and C-27 of the intermediate sterols. It has been established that the 1st methylation leading to 24-methylenecholesterol from desmosterol involves a *Re*-face hydrogen migration from C-24 to C-25 based on unambiguous assignment of the isopropyl pro-*R*-Me and pro-*S*-Me of 24-methylenecholesterol. The 2nd methylation leading to isofucosterol was revealed to proceed in a *trans*-mechanism in which addition of the methyl group and elimination of the C-28 hydrogen occur on opposite faces of the original $\Delta^{24(28)}$ plane. The double bond isomerization from $\Delta^{24(28)}$ to $\Delta^{24(25)}$ was found to proceed in a *syn*-S_E2' mechanism with the pro-*S*-methyl group of isofucosterol becoming the (*E*)-methyl of 24-ethyl-desmosterol. Finally, feeding studies of [*E*-Me-¹³C]- and [*Z*-Me-¹³C]-24-methyl-desmosterols established that an *anti*-mode of hydrogen addition is operating in the conversion of 24-methyl-desmosterol to campesterol and dihydrobrassicasterol. Similar studies established that 24-ethyl-desmosterol is converted to sitosterol in an *anti*-mode of hydrogen addition. In addition, the mechanism of sterol side-chain formation in hairy roots of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* is briefly described.

Key words—sterol; biosynthesis; plant cell culture; stereochemistry; stable isotope

はじめに

代表的な植物ステロールは、動物のコレステロールと異なり、その側鎖の24位にメチル基又はエチル基を有している。高等植物においては、これら24-alkylsterolの側鎖は、Fig. 1に示す経路で生合成されると提唱されている[cycloartenolの骨格変換(4位のdimethyl, 14位のmethylの脱離等)も起きているが、本論文では側鎖の変換機構に焦点を当てて議論するので、実際の取り込み実験の基質の構造に合わせて、骨格部は Δ^5 -3 β -ol構造で代表し、ステロール名もこれに従って表記してある]。すなわち、desmosterol **1**の24-eneへの Δ^{24} -sterol meth-

yl transferaseの作用により、*S*-adenosyl-L-methionine (SAM)からのメチル基転移を受け、まず24-methylenecholesterol **2**が生成する。Campesterol **3**及びdihydrobrassicasterol **4**の生成においては、**2**が24-methyl-desmosterol **5**に異性化した後に還元され、またsitosterol **6**の生成では、**2**がさらにmethyl化されてisofucosterol **7**となり、同様に、24-ethyl-desmosterol **8**に異性化した後に還元により生じるとされている。¹⁾

我々は先に草食性昆虫におけるsitosterolからcholesterolへの変換において鍵となるfucosterol epoxideからdesmosterolへの炭素-炭素切断反応を触媒するfucosterol epoxide lyaseの反応過程におい

Fig. 1. Biosynthetic Route of Typical Plant Sterols

Among C-26 and C-27, carbons which are derived from C-2 of mevalonate are indicated by black circles.

Fig. 2. Stereochemical Features in the Fucosterol Epoxide Lyase-catalyzed Conversion of Fucosterol Epoxide to Desmosterol in Phytophagous Insect

て、C-26, C-27 の diastereotopic なメチル基が区別して認識されているか、更に C-25 から C-24 への水素の転位はどのような conformation で進行するのかについて興味を持ち、Fig. 2 に示す機構で反応が進行することを明らかにした。^{2,3)} このような観点から Fig. 1 の生合成経路をみると、妹尾らによる $^{13}\text{C}_2$ -acetate の投与実験に基づき、植物ステロール 3, 4, 5 については、diastereotopic なメチル基 (C-26, C-27) の起源が mevalonate の C-2, C-6 いずれであるかについては報告はあったが、中間体ステロールについては曖昧もしくは不明であった。そこで、我々は立体化学を含むより詳細な反応機構の解明を目指した研究を行い、その全容をほぼ明らかにすることができたので本稿でまとめて紹介する。

1. 24-Ethyl-desmosterol 及び 24-Methyl-desmosterol が生合成中間体であることの証明

本研究を始めるに当たって、中間体とされているにもかかわらず情報の乏しい 4 置換オレフィン体 8, 5 に関して positive な知見を得ることからスタートした。高等植物から 8, 5 の同定の報告は数例あるが、それらの植物ステロールへの取り込みについては negative な報告があるのみであった。そこ

で、化学的に合成した標識体 $[26,27-^{13}\text{C}_2]$ -24-ethyl-desmosterol 及び $[26,27-^{13}\text{C}_2]$ -24-methyl-desmosterol を、イネ (*Oryza sativa*) 及びニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 培養細胞に投与した。ステロール分画を HPLC で分取して得た sitosterol 6 (Fig. 3) 及び 24-methylcholesterol 3/4 (Fig. 4) の ^{13}C -NMR 分析の結果、8 は 6 に、また、5 は 3 と 4 に、それぞれ変換されることが明確に示された。⁴⁾ この結果は、高等植物における 24-alkylsterol 側鎖生合成の最終過程が 8, 5 の還元であることを強く支持するものである。

2. Desmosterol から 24-Methylencholesterol への変換機構

この過程は、 Δ^{24} に対する SAM からのメチル基転移による C-24-methylenation の過程であり、24 位の水素の 25 位への転位を伴うことが知られている。この過程の反応機構として、メチル基が 24 位において Re 面, Si 面のいずれから導入されるか、及び、引き続いて転位する水素が 25 位の Re 面, Si 面のいずれから導入されるかに関して Fig. 5 に示す 4 つの立体化学的機構が考えられる。Arigoni の先駆的な研究により、酵母における ergosterol 生合成

Fig. 3. ^{13}C -NMR Spectrum (in part) of Sitosterol Derived from $[26,27\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -24-Ethylidestosterol in *O. sativa* Cell Cultures

の際の水素の転位は 25-*Re* 面から導入される path a が提唱されていた。⁵⁾ 高等植物においても、妹尾らにより同様な機構が推定されていたが、⁶⁾ 24-methylenecholesterol **2** の問題の C-26, C-27 の ^{13}C -NMR の帰属が曖昧であり、 ^{13}C 標識を用いた生合成研究でその立体機構を論じることができなかった。

我々は、先に合成を報告した 24-ケトン体 **9a**, **9b**²⁾ から、*pro-R* 及び *pro-S* のメチル基をそれぞれ選択的に ^{13}C 標識した **2** を、化学的に合成 (Fig. 6) することにより、**2** の *pro-R*-メチル基、*pro-S*-メチル基の ^{13}C 化学シフトを確実に帰属した。⁷⁾

ついで、ニチニチソウの培養細胞に $[E\text{-Me-}^{13}\text{C}]$ -desmosterol を投与し、得たステロール分画の HPLC 分取により **2** を単離した。この ^{13}C -NMR 分析により、**2** の *pro-S*-メチル基が選択的に ^{13}C 標識されていることが示された (Fig. 7)。この結果、**1**

Fig. 4. ^{13}C -NMR Spectra (in part) of Campesterol/Dihydrobrassicasterol Derived from $[26,27\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -24-Methylidestosterol in *C. roseus* (top) and *O. sativa* (bottom) Cell Cultures

の 25-*Re* 面から水素が導入され **2** が生じることが確実となった。⁷⁾ 我々の結果は *Physalis peruviana*, *Trichosanthes kirilowii*⁶⁾ 及びその後発表されたトウモロコシ *Zea mays*⁸⁾ における結果と一致しており、広く高等植物において普遍性があると考えられる。現段階では Fig. 5 において括弧で括って示したメチル化直後のカチオン中間体についての情報が欠如しているので、path a 及び path c のいずれであるかは特定できないが、後述の codisterol などの 24 β -methylsterol の 24-メチル化の立体化学 (メチル基の導入は 24-*Si* 面より、Fig. 21 参照) 並びに水素転

Fig. 5. Four Possible Steric Courses in the Conversion of Desmosterol to 24-Methylenecholesterol
Path a was found to be most likely.

Fig. 6. Synthesis of Stereochemically Defined, pro-*R*-Me- and pro-*S*-Me- ^{13}C Enriched 24-Methylenecholesterols

Fig. 7. ^{13}C -NMR Spectra (in part) of 24-Methylenecholesterol

(A): synthetic [pro-*R*-Me- ^{13}C]-2, (B): synthetic [pro-*S*-Me- ^{13}C]-2, (C): 2 derived from [*E*-Me- ^{13}C]-desmosterol in *C. roseus* cell cultures, (D): 2 derived from [26,27- $^{13}\text{C}_2$]-desmosterol in the same cultures.

位の際の上記 25-カチオン中間体の 24,25-単結合の回転角度がより小さいことが好ましいことを考慮すると、本過程は path a で進行するとするのが妥当であろう。

3. 24-Methylenecholesterol から Isofucosterol への変換機構

Isofucosterol 7 は 24-methylenecholesterol 2 の 28 位での SAM からのメチル基転移に続いて 28 位の水素の一方が脱離することによって生成する。この反応は上述の Δ^{24} -sterol methyl transferase による 1 段階目のメチル化に対して 2 段階目のメチル化反応と呼ばれる。この 2 段階目のメチル化過程は、同じ Δ^{24} -sterol methyl transferase によって行われるとの報告もあり、高等植物において特定の $\Delta^{24(28)}$ -sterol methyl transferase が存在するか否かについては今後の研究を待たねばならない。⁹⁾ この研究開始時点では、7 の pro-*R*-, pro-*S*-メチル基のいずれが mevalonate C-2 炭素由来であるかについて *Pinus pinea* と *Physalis peruviana* において相反する報告がなされていた。そこで、まずニチニチソウ培養細胞において、 $^{13}\text{C}_2$ -acetate の投与実験を行い、得られた 7 の ^{13}C -NMR 分析において ^{13}C - ^{13}C カップリングは C-25 と pro-*R*-メチル基にのみ観察されたことから、pro-*S*-メチル基が mevalonate C-2 炭素由来

(*Physalis peruviana* の場合と同じ) であることが分かった。¹⁰⁾ この結果は、同培養系における 2 から 7 への変換過程において 25 位の立体化学に変化がないことを示している。

この 2 段階目のメチル化過程については、SAM 由来のメチル基の付加が C-28 の *Re* 面, *Si* 面のいずれから起こるか、その後 28 位から脱離する水素は pro-*R*-水素, pro-*S*-水素のいずれかに関して 4 つの立体化学的機構が可能である。これらをすべて図示すると複雑になるのでここでは仮にメチルの付加が 28-*Si* 面から進行するとして、2 の $\Delta^{24(28)}$ で規定される面を考えて、メチル基の付加と水素の脱離が、この面の同じ側で起こる機構 (*cis*-機構) と逆側で起こる機構 (*trans*-機構) (Fig. 8) のうち、いずれであるかを明らかにすることにした。実験的には 2 の 28*E*-水素, 28*Z*-水素の挙動を追跡すればよい。

そこで、[28*E*- ^2H]-2 及び [28*Z*- ^2H]-2 を合成し、クワ (*Morus alba*) 培養細胞にこれらを投与した。得られた 7 の ^2H -NMR 分析 (Fig. 9) により、2 の 28*E*-水素は 7 の 28 位に保持されるのに対し、28*Z*-水素は変換過程で消失することが分かった。よって、2 から 7 への変換は *trans*-機構で進行していることが判明した。¹¹⁾ この場合もカチオン中間体の 28 位の立体化学については不明であり、メチル基の付加が

Fig. 8. *trans*- and *cis*-Mechanisms of the Conversion of 24-Methylenecholesterol to Isofucosterol
The former one was found to be correct.

Fig. 9. ²H-NMR Spectra of Isofucosterol Obtained from: (A) [28*E*-²H]-2, (B) [28*Z*-²H]-2
The ¹H-NMR spectrum of non-labeled 7 is shown in (C).

28位の Re 面, Si 面のいずれから起こるかについては確証はない. Djerassiらは海綿 *Xestospongia testudinaria* において ³H/¹⁴C-標識基質を用いて同様な取り込み実験を行い, [28*E*-³H]-2はisofucosterolのみに取り込まれるが, [28*Z*-³H]-2はisofucosterol 7にも fucosterol ($\Delta^{24(28)E}$ 体)にも取り込まれる結果を得て, これを³H同位体効果により説明し *trans*-機構であるとしている.¹²⁾ 我々の実験では, いずれの標識体の投与においても fucosterolの生成は認められなかった.

4. Isofucosterolから24-Ethylcholesterolへ, 及び24-Methylenecholesterolから24-Methylcholesterolへの変換機構

この二重結合が $\Delta^{24(28)}$ から $\Delta^{24(25)}$ に異性化する過程については, 基質の25位, 生成物の28位ともにプロキラル中心なのでそれぞれの立体化学的挙動を別々に明らかにして両者を併せて全体として*syn*-

または*anti*-機構のいずれであることを明らかにせねばならない. 本例はこのようなケースの初めての解決例である. 例えば, cholesterolの生合成過程における Δ^8 から Δ^7 への二重結合の異性化反応では単に7位のメチレン水素のうちいずれが脱離するかを調べればよく, ラットでは*anti*-,¹³⁾ 酵母では*syn*-機構¹⁴⁾で進行することが報告されている. ここでは, 25位に関して, 及び28位に関しての2つに分けて述べることにする.

4-1. 25位に関して Isofucosterol 7及び24-methylenecholesterol 2のpro- R -メチル, pro- S -メチル基が24-ethylcholesterol 8及び24-methylcholesterol 5の(E)-メチル, (Z)-メチル基のいずれに変換されるかを明らかにしたい. しかしながら, 我々の手持ちのいずれの植物培養細胞も8を含有していないので直接この解を求めることはできない. しかしながら, 7と6及び8と6を関係付けること

ができれば、間接的にはあるが7と8との関係を明らかにできる (Fig. 10). 8と6の関係は後述するように明らかにできたので (Fig. 19), ここでは7と6の関係について述べる.

24-ケトン体9aから化学的に合成した [pro-*R*-Me-¹³C]-7 (pro-*R*-Me: 78% ¹³C, pro-*S*-Me: 22% ¹³C) をイネ培養細胞に投与し、得た6の¹³C-NMR解析 (Fig. 11) を行い、7のpro-*R*-メチル基が6のpro-*R*-メチル基になることを示した.¹⁵⁾ この結果、7のpro-*R*-メチル、pro-*S*-メチル基が、それぞれ8の(*Z*)-メチル、(*E*)-メチル基になることが分かった (Fig. 10).

同様に、24-ケトン体9bから合成した [pro-*S*-Me-¹³C]-24-methylenecholesterol 2 (pro-*S*-Me: 80% ¹³C, pro-*R*-Me: 20% ¹³C) をイネ培養細胞に投与

し、得た campesterol 3 及び dihydrobrassicasterol 4 (混合物) の¹³C-NMR解析 (Fig. 11) により、2のpro-*S*-メチル基が3のpro-*S*-メチル基、4のpro-*R*-メチル基となることを明らかにした.¹⁵⁾ このことは、後述 (Fig. 16) の5と、3及び4の関係を考慮すると、2のpro-*R*-メチル基、pro-*S*-メチル基が、それぞれ5の(*Z*)-メチル基、(*E*)-メチル基になることを示している (Fig. 10).

4-2. 28 位に関して この項における問題設定は、2重結合の移動に伴って新しく生成した28位メチレン炭素上の2つの水素を何らかの方法で区別し、7の28位由来の水素 (Ha) と新たに導入された水素 (Hb) を識別すること (Fig. 12) であるが、これは従来の方法で区別することは困難であると考えられた. そこで、今回、Vedersらにより開発さ

Fig. 10. Correlations of the Pro-*R*- and Pro-*S*-Methyls of 24-Methylenecholesterol and Isofucosterol with *Z*-Methyl and *E*-Methyl, Respectively, of 24-Methylcholesterol and 24-Ethylcholesterol

Fig. 11. ¹³C-NMR Spectra (in part) of 6 Derived from [Pro-*R*-Me-¹³C]-7 (left) and of 3, 4 Derived from [Pro-*S*-Me-¹³C]-2 (right)

れた ^{13}C - ^2H が直結した基質の取り込み実験を行い得られた代謝物の ^1H 及び ^2H をブロードバンドデカップル下に C-H 相関スペクトルを測定する方法 ($\{^1\text{H}\} \{^2\text{H}\}$ 2D-NMR)¹⁶⁾ を用いて、この問題の解決を試みた。この方法は重水素が結合した ^{13}C のシグナルが高磁場シフトすることを意識的に利用したものであり、例えばメチレン水素のようなお互いに比較的小さい化学シフトの差しかないもの同士を区別可能である。上述したように **8** は蓄積しないので、最終産物 sitosterol **6** について解析することにした。なお、この 2 重結合の移動過程は水素の 1,3-転位で進行するのではないことが分かっている。

まず、**6** の 28 位メチレン水素の ^1H -NMR の帰属を行った。[28-pro- R - ^2H]-(**6a**) 及び [28-pro- S - ^2H]-sitosterol(**6b**)(Fig. 13) を合成し、 $\{^1\text{H}\} \{^2\text{H}\}$ heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) スペクトルを測定した (Fig. 14)。これを **6** の $\{^1\text{H}\} \{^2\text{H}\}$ HMQC スペクトルと比較することにより、28-pro- R -水素が $\delta 1.24$ 、28-pro- S -水素が $\delta 1.28$ と帰属できた。つぎに、[28- ^{13}C , 28- ^2H]-isofucosterol **7a** (Fig. 13) を合成し、イネ培養細胞への投与実験を行った。得られた **6** の $\{^1\text{H}\} \{^2\text{H}\}$ HMQC 分析 (Fig. 14) により、**7** の 28 位水素は **6** の 28-pro- R 水素 (すなわち **5** の 28-pro- R -水素) へと変換されることが分かった (Fig. 12).¹⁷⁾ 同じ結果をクワ培養細胞においても得た。

以上の結果を合わせて考察すると、isofucosterol **7** の 24-ethylidnesmoesterol **8** への異性化反応は、脱離する C-25-水素 (Hc) と新たに C-28 に導入される

水素 (Hb) が同じ面 (28- Si 面) で起こる $\text{syn-S}_{\text{E}}2'$ の反応機構 (Fig. 15) で進行すると結論される。¹⁷⁾ この 2 重結合の異性化反応が協奏的機構なのか、protonation-deprotonation の stepwise 機構で進むのかについてははっきりしていないが、いずれの場合でもここに示した立体化学的要請を満たす必要が

Fig. 12. Two Steric Courses at the C-28 Position in the Conversion of Isofucosterol to 24-Ethylidnesmoesterol and Sitosterol

Hb was found to be introduced from 28- Si face.

Fig. 13. Chemical Structures of **6a**, **6b**, and **7a**

Fig. 14. $\{^1\text{H}\} \{^2\text{H}\}$ HMQC Spectra of Sitosterol

(A): **6** biosynthesized from [28- ^{13}C , 28- ^2H]-isofucosterol **7a**, (B): [28-pro- R - ^2H]-**6a**, (C): [28-pro- S - ^2H]-**6b**, (D): non-labeled **6**.

Fig. 15. *Syn*- and *Anti-SE2'* Mechanisms of the Double Bond Isomerization from $\Delta^{24(28)}$ to $\Delta^{24(25)}$
The former mechanism was found to be correct.

ある。

24-Methylenecholesterol から 24-methyl-desmosterol へ 2 重結合の異性化も同様に *syn-SE2'* 機構で進行すると考えられるが、これを実験的に証明するには 28 位の 3 つの水素を区別することになり、いわゆるキラルメチルの化学 (H, ^2H , ^3H の標識) が必要となる。

5. 24-Methyl-desmosterol の Campesterol/Dihydrobrassicasterol への還元立体化学

この還元反応の立体化学については、我々の用いている植物培養細胞系に $^{13}\text{C}_2$ -acetate を投与して得た 3, 4 の C-26, C-27 の起源に関する情報から、¹⁸⁾ Fig. 16 に示す *anti*-, *syn*-機構の 2 つの可能性が想定される。最初に述べたように 5 から 3/4 への変換は確認済みであるので、位置選択的に ^{13}C 標識した [*E*-Me- ^{13}C] 若しくは [*Z*-Me- ^{13}C]-24-methyl-desmosterol (5a, 5b) が入手できればそれらの投与実験によりいずれの機構であるか区別できる。

位置選択的に安定同位体標識した 4 置換オレフィンの合成について種々検討し、(*E*)-, (*Z*)-異性体をアリルアルコールの段階で分離することを含む Fig.

17 に示す経路で目的の ^{13}C 標識体 5a, 5b を合成することができた。¹⁸⁾

イネ培養細胞へ 5a, 5b を投与して得た 24-methylcholesterol 3/4 の ^{13}C -NMR 分析 (Fig. 18) により, campesterol 3, dihydrobrassicasterol 4 はいずれも *anti*-付加の機構に合致する標識パターンを示すことが分かった。ニチニチソウ培養細胞における投与実験においても同一な結果が得られた。¹⁸⁾ この *anti*-付加の機構は、脊椎動物における cholesterol 生合成の最終ステップである desmosterol の Δ^{24} の還元が *syn*-付加機構 (24-Si, 25-Si から水素が付加) であること¹⁹⁾ と異なっている。

6. 24-Ethyl-desmosterol から Sitosterol への還元立体化学

この還元反応の立体化学についても、*anti*-, *syn*-機構の 2 つの可能性 (Fig. 19) があり、これらは、位置選択的に ^{13}C 標識した [*E*-Me- ^{13}C]-24-ethyl-desmosterol 8a 若しくは [*Z*-Me- ^{13}C]-24-ethyl-desmosterol 8b の投与実験により区別できるはずである。そこで、Fig. 17 と同様な経路で両 ^{13}C 標識体を合成し、イネ培養細胞に投与して得た 6 の ^{13}C -NMR 分析を行い、Fig. 20 に示すように、8 の *E*-メチル基が 6 の *pro-S*-メチル基となることを示した。したがって、この場合も *anti*-付加の機構で還元が進行することが明らかとなった。²⁰⁾

7. Ajuga 毛状根におけるステロール側鎖生合成

上述の高等植物 (細胞培養系) と異なり, *Ajuga* sp. は Δ^{25} -ステロール類 (clerosterol 10, dehydroclerosterol 11, cholesterol 及び微量の codisterol 12) を含有している。また, *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* の毛状根が植物エクジステロイド生合成研究の格好の実験系であるので、この関連において本毛状根においても ^{13}C 標識 desmosterol 等の投与実験に基づく植物ステロール生合成の研究を行い、Fig. 21 に示す結果を得た。²¹⁾ 10, 11 及び 12 について特徴的なことのみを記載すると、側鎖末端のメチル基が mevalonate の C-2 由来であること、それらの C-24 に desmosterol の C-24-水素が存在することである。また, clerosterol は植物エクジステロイドで

Fig. 16. Two Possible Mechanisms of the Reduction of 24-Methyl-desmosterol Leading to Campesterol and Dihydrobrassicasterol
An *anti*-addition of hydrogen atoms was found to be correct.

Fig. 17. Synthesis of (*E*-Me-¹³C)- (**5a**) and (*Z*-Me-¹³C)- (**5b**) 24-Methylidesmosterols

i) acetone, LDA; MsCl, Et₃N; DBU; H₂, Pd-C (50%), ii) LDA, CH₃CN (91%), iii) LDA, ¹³CH₃I (41%), iv) SOCl₂ (100%), v) DIBAL leading to aldehyde; then DIBAL leading to the *cis*-allyl alcohol (19%) and the *trans*-allyl alcohol (25%), vi) MsCl, LiCl, lutidine; LiAlH₄ (70%), vii) TsOH, H₂O (80%).

Fig. 18. ¹³C-NMR Spectra (in part) of Campesterol/Dihydrobrassicasterol

Top: derived from [*E*-Me-¹³C]-24-methylidesmosterol **5a**, Bottom: derived from [*Z*-Me-¹³C]-24-methylidesmosterol **5b**.

Fig. 19. Two Possible Mechanisms of the Reduction of 24-Ethylidesmosterol Leading to Sitosterol

An *anti*-addition of hydrogen atoms was found to be correct.

ある cyasterone の前駆体であることも明らかとなった。²²⁾ *Ajuga* 毛状根におけるステロール並びにエクシステロイドの生合成機構についての詳細は我々の最近の総説に述べてある。²²⁾

おわりに

24-Ethylsterol の場合, その 24 α 体と 24 β 体 [本稿の図のように側鎖を描いた場合, 24 位の置換基が太線 (手前側) で表せるものが 24 α 体, 点線 (裏側) が 24 β 体] が同一植物中に共存することはないが, 24-methylsterol は, 一般に 24 α 体と 24 β 体がほぼ同率で共存することが多い。24 α -Ethylsterol は主として高等植物に分布し, Fig. 1 に示したように 4 置換オレフィン **8** の還元反応で生合成される。一方, クロレラなど比較的下等な植物中の主ステロールである 24 β -ethylsterol については本稿では述べなかったが, Δ^{25} -エキソメチレン体 (例えば **10**) の還元で生合成されることが明らかとなっている。²³⁾ 24-

Fig. 20. ^{13}C -NMR Spectra (in part) of Sitosterol Samples Derived from **8a** and **8b**

Top: derived from $[E\text{-Me-}^{13}\text{C}]\text{-8a}$, Bottom: derived from $[Z\text{-Me-}^{13}\text{C}]\text{-8b}$

Methylsterol の場合は、現在のところ上述したように 24α 体、 24β 体とも 4 置換オレフィン **5** が生合成中間体と考えられている。しかしながら、最近我々は Δ^{25} -エキソメチレン体である codisterol **12** 及びその 24 -エピマーがともにイネ培養細胞中で **3** 及び **4** に変換されることを見出した。²⁴⁾ このように Δ^{25} -エキソメチレン体は 24β -ethylsterol に限らず 24 -methylsterol の生合成においても重要な前駆体として機能しているのかもしれない。これと関連して

イネ培養細胞及び *Ajuga* 毛状根において Δ^{25} -cholesterol が cholesterol に変換されること²⁵⁾ も興味深い。

謝 辞

ニチニチソウ培養細胞をご供与並びにクワ培養細胞系の確立にご協力頂きました岡山理科大基礎理学科浜田喜博先生に深謝致します。イネ培養細胞をご供与頂きました農業生物資源研究所土岐精一博士、*Ajuga* 毛状根をご供与頂きましたダイセル化学工業(株)松本 武博士に深謝致します。また、 $\{^1\text{H}\}$ $\{^2\text{H}\}$ HMQC スペクトルを初め各種スペクトルの測定をして頂きました東京工業大学理工学研究科原 典行助手に厚く御礼申し上げます。本稿で紹介した研究は、共同研究者である多くの学生諸氏 (文献に記載) の献身的な努力の成果であり、ここに心から謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Nes W. R., McKean M. L., "Biochemistry of Steroids and Other Isoprenoid," University Park Press, Baltimore, 1977, p. 325.
- 2) Fujimoto Y., Ikuina Y., Nagakari M., Kakinuma K., Ikekawa N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 2041-2046.
- 3) Ikekawa N., Morisaki M., Fujimoto Y., *Acc. Chem. Res.*, **26**, 139-146 (1993).
- 4) Yamada J., Morisaki M., Iwai K., Hamada H., Sato N., Fujimoto Y., *Tetrahedron*, **53**, 877-884 (1997).
- 5) Arigoni D., *Ciba Found. Symp.*, **60**, 243-261 (1978).
- 6) Seo S., Uomori A., Yoshimura Y., Takeda K., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6343-6344 (1983); *idem*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**,

Fig. 21. Biosynthesis of *Ajuga* Δ^{25} -Sterols

- 1174–1176; Seo S., Uomori A., Yoshimura Y., Sankawa U., Ebizuka Y., Seto H., Takeda K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1987**, 1876–1878.
- 7) Fujimoto Y., Ohyama K., Sato N., Yamada J., Morisaki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 224–226 (1997).
- 8) Guo D., Jia Z., Nes W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8507–8508 (1996).
- 9) Nes W. D., McCourt B. S., Marshall J. A., Ma J., Dennis A. L., Lopez M., Li H., He L., *J. Org. Chem.*, **64**, 1535–1542 (1999).
- 10) Fujimoto Y., Sato N., Sekiyama Y., Ito M., Suzuki T., Hamada H., Morisaki M., *Nat. Prod. Lett.*, **11**, 207–210 (1998).
- 11) Okuzumi T., Kaji Y., Hamada H., Fujimoto Y., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3623–3626 (2000).
- 12) Zimmerman M. P., Djerassi C., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3530–3533 (1991).
- 13) Akhtar M., Rahimtula, A. D., Watkinson I. A., Wilton, D. C., Munday, K. A., *Eur. J. Biochem.*, **9**, 107–111 (1969), and references cited therein.
- 14) Akhtar M., Rahimtula, A. D., Wilton, D. C., *Biochemical J.*, **117**, 539–542 (1970).
- 15) Nasu K., Takahashi K., Morisaki M., Fujimoto Y., *Phytochemistry*, **54**, 381–385 (2000).
- 16) Rawlings B. D., Reese P. B., Ramer S. E., Vederas J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3391–3399 (1989) and references cited therein.
- 17) Okuzumi T., Hara N., Fujimoto Y., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 8863–8866 (1999).
- 18) Fujimoto Y., Sato N., Iwai K., Hamada H., Yamada J., Morisaki M., *Chem. Commun.*, **1997**, 681–682.
- 19) Kienle M. G., Varma R. K., Mulheirn L. J., Yagen B., Caspi E., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1996–2000 (1973).
- 20) Fujimoto Y., Sato N., Okuzumi T., Yamada J., Morisaki M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 205–208 (1998).
- 21) Yagi T., Morisaki M., Kushiro T., Yoshida H., Fujimoto Y., *Phytochemistry*, **41**, 1057–1064 (1996).
- 22) Fujimoto Y., Ohyama K., Nomura K., Hyodo R., Takahashi K., Yamada J., Morisaki M., *Lipids*, **35**, 279–288 (2000).
- 23) Seo S., Uomori A., Yoshimura Y., Takeda K., Seto H., Ebizuka Y., Noguchi H., Sankawa U., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1989**, 1969–1974; Uomori A., Seo S., Iwatani K., Nakagawa Y., Takeda K., Sankawa U., *Phytochemistry*, **31**, 3861–3864 (1992).
- 24) Nasu K., Takahashi K., Morisaki M., Fujimoto Y., unpublished results.
- 25) Nagano M., Yamada J., Yazaki-Yagi T., Morisaki M., Nakagawa T., Fujimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 944–946 (1997).