

胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究

東京工業大学理学部
藤本善徳

Cholic acid biosynthesis from cholesterol involves C-24/C-25 bond cleavage. A precursor of the bond cleavage reaction is $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA) and this acid is converted into cholic acid by a mechanism similar to that of the β -oxidation of fatty acids. This research has focused on the stereochemical aspects of this C-C bond cleavage reaction and led to the following findings.

Evidence of the enzymatic formation of 24-oxo-THCA from Δ^{24} -THCA has been obtained for the first time by the use of ^{13}C as a tracer. All of the four stereoisomers of $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha, 24$ -tetrahydroxycoprostan-26-oic acid (TeHCA) were formed when THCA was incubated with rat liver mitochondrial fraction. In contrast, (24R, 25R)-THCA was formed when 700g supernatant fraction was used for incubation. The (25R)-stereochemistry is noteworthy, since (3S)-hydroxy intermediate is known for β -oxidation of fatty acids. 27-Nor analogs of THCA and Δ^{24} -THCA were also incubated with the mitochondrial fraction to give a mixture of (24R)- and (24S)-24-nor-TeHCA.

1. 緒言

コール酸(1)に代表される胆汁酸類は肝臓においてコレステロールから生合成される。コレステロールがまず骨格における水酸化等の変化をうけ、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA)(2)となり、さらに側鎖末端の酸化を受けて $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA)(2)となり、これが、 β -酸化タイプの反応で側鎖のC-24とC-25の間で切断をうけ、コール酸が生合成されるとされている¹⁾。

我々はステロイド代謝における炭素-炭素結合切断のメカニズムの研究(例えば、昆虫における植物ステロールのコレステロールへの変換機構²⁾、微生物による植物ステロールの側鎖切断の機構³⁾を解明してきた)の一環として、本炭素-炭素結合切断を取り上げ、どのような立体化学的制御のもとに反応が進行しているのかを含めて有機化学

的立場からその詳細について解明を試みることにした。

我々は先に、この反応の中間体と考えられる $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha, 24$ -tetrahydroxycoprostan-26-oic acid (TeHCA) (3)の24位、25位に関する4

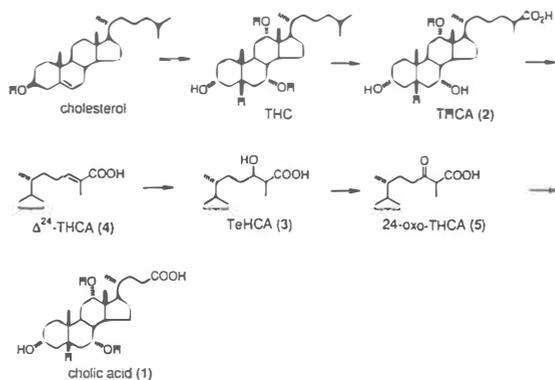


Fig. 1 Biosynthetic pathway of cholic acid
The COOH residue can be regarded as COSCoA in the biological system.

Studies on the biosynthesis of bile acid

Yoshinori Fujimoto

種の立体異性体の合成法を開発しその立体配置を確定した(この結果以前に報告されていた立体化学は訂正を要することが明らかとなった)⁴⁾。

次いで、この4種の異性体をラット肝ミトコンドリアとインキュベートすると、いずれもコール酸に変換されることを報告した⁵⁾。この立体選択性の欠如は注目に値しよう。

このような背景のもとに以下に示す実験を実施した。

2 / 3. 実験および結果

2 / 3. 1. ¹³C 標識 THCA (6) および Δ^{24} -

THCA (7) の合成

従来の研究では胆汁酸の生合成研究は放射性同位元素(¹⁴C)を用いて行われてきた。今回、新しいアイデアとして初めて我々は安定同位元素(¹³C)で標識した THCA および Δ^{24} -THCA を合成し、これらをインキュベートすることにより、予想される TeHCA および 24-オキソ THCA を含めて代謝物を ¹³C-NMR で分析することにした。¹³C の導入部位は合成の簡便さを考慮して 27 位とすることにした。^{[27-¹³C]-THCA (6) および [27-¹³C]- Δ^{24} -THCA (7) を目的化合物とし、Fig. 2 に示す方法で合成することができた。すなわち、アルデヒド(8)を原料とし ¹³C 標識イリド(9)と反応させ、不飽和エステル(10)を得た。これを加水分解し(7)を得た。また、(10)を接触還元後、加水分解し(6)を得た。}

(7)の¹³C-NMRスペクトルは δ 12.37および21.02に強いピークを示し、 Δ^{24} に関してトランス体が95%シス体が5%の混合物であった。(6)は δ 17.55および17.75に強いシグナルを示し25位のR/S体の混合物であった。さらに、ODSカラムによるHPLCのTHCAの25位立体異性体の溶出順序は報告されているので、本サンプルを同様な条件で分離しNMRにて27位が δ 17.55に観察される異性体が25S体、17.75のものが25R体とアサインできた。

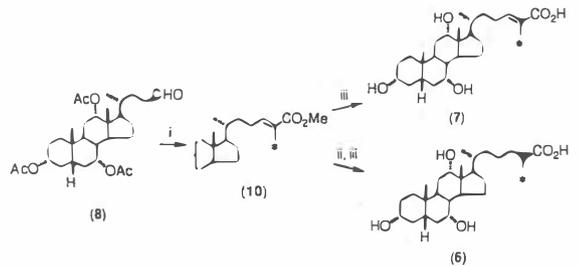


Fig. 2 Synthesis of ¹³C-labelled Δ^{24} -THCA and THCA
Reagents: i, $[\text{Ph}_3\text{PCH}(\text{}^{13}\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{Me}]^+\text{Br}^-$ (9), *n*-BuLi; ii, $\text{H}_2/10\%\text{Pd-C}$; iii, KOH-MeOH

2 / 3. 2. ラット肝無細胞酵素系における Δ^{24} -THCA の 27-nor-3 α , 7 α , 12 α -tri-hydroxycoprostan-24-one への変換

上で合成した¹³C-標識体(各1.0mg)をラット肝無細胞酵素系(10,000g 上清, Tris緩衝液pH8.5, Mg^{2+} , ATP, CoA, NADを添加, 蛋白量10 mg/ml)と37.5°C, 1時間インキュベートした。エタノールおよび10%NaOHを加え5時間還流した。酢酸エチルで抽出し、濃縮残渣をLH-20(メタ

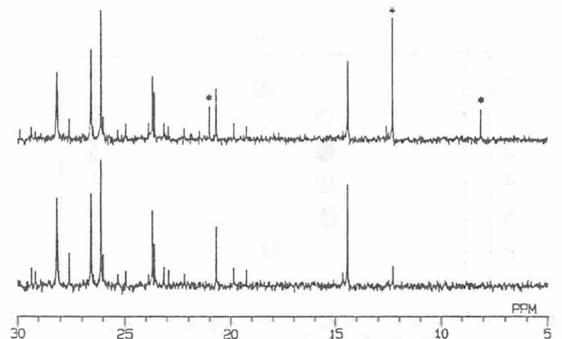


Fig. 3 ¹³C-NMR spectra (in part) of incubation product
Upper: derived from $[\text{}^{13}\text{C}]-\Delta^{24}$ -THCA (7).
Lower: background from incubation medium. Asterisk signals at δ 21.02, 12.37 and 8.16 are due to (Z)- and (E)-C-27 carbons of (7), and a new carbon, respectively.

ノールで溶出)を通した後、 ^{13}C -NMRを測定した。未反応の原料シグナルの他に、新たなシグナルが ^{13}C 標識 Δ^24 -THCAのインキュベーションサンプルに観察された⁶⁾。

この化学シフトと ^{13}C 標識の化学的環境から、このシグナルは27-nor-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-24-one(11)の26位の炭素に帰属されると考えた。事実、合成した標品のC-26は全く同じ化学シフトを示した。

さらに、先の濃縮残渣をp-TLCにて標品ケトンに相当する部分を分離しトリメチルシリルエーテル誘導体としGC-MSにより分析したところ、保持時間が標品ケトンと同じ位置にピークを示し、そのマススペクトルは標品より1マス高くシフト

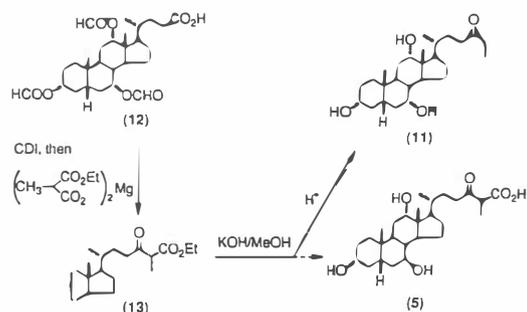
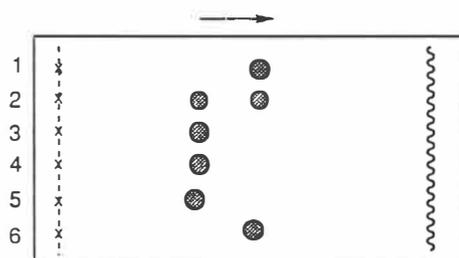


Fig.4 Attempted synthesis of 24-oxo-THCA(5)



- 1: After completion of hydrolysis
- 2: After addition of 1 eq. of sat. aq. NH_4Cl
- 3: After addition of excess sat. aq. NH_4Cl
- 4: authentic ethyl ketone (11)
- 5: THCA (2)
- 6: cholic acid (1)

Fig.5 Chemical stability of 24-oxo-THCA(5)
TLC was performed by Merck RP18-F254 plate with $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1) as a developing solvent.

していた。

さらに、TeHCAの4種の立体異性体のいずれが(酵素的に酸化されて)エチルケトン体を与えるのかを、標識されていないTeHCAを同様な条件でインキュベーションして調べたところ、いずれの異性体からもエチルケトン体(11)を与えることがわかった。

THCAを基質としたインキュベーションではエチルケトン体のC-26のシグナルは観察されなかった。

2/3.3. 24-Oxo-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-26-oic acidの化学的安定性

上の実験結果は、 Δ^24 -THCAが酵素反応(hydratase, oxidase)にて24-oxo-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxycoprostan-26-oic acid(またはそのCoAエステル)に変換された後に化学的に脱炭酸したと考えられるので、標記化合物の合成を試みた。

コール酸トリホルミルエステル(12)をイミダゾライドとして活性化しマロン酸の半エチルエステルのマグネシウム塩と反応させケトンエステル(13)を得た。これをKOH/MeOHで加水分解した。この反応溶液は逆相TLCでケトカルボン酸のスポットを示す。しかしながら、この混合物を抽出に先立ち中和するために、2N-HClまたは飽和 NH_4Cl を加えてTLCを追いかけると、徐々に上記のスポットは消えて新たにエチルケトン体(11)に相当するスポットが現れてくることわかった⁶⁾。

2/3.4. TeHCAの生成過程における立体化学について

2/3.4.1. THCAのインキュベーション

既に、THCAがラット肝の無細胞系でcholic acidに変換されることは実験的に確かめられている。また、この無細胞酵素系でNAD非存在下では、TeHCAが微量生成することも報告がある。今回、4種のTeHCAの立体異性体のうちいずれ

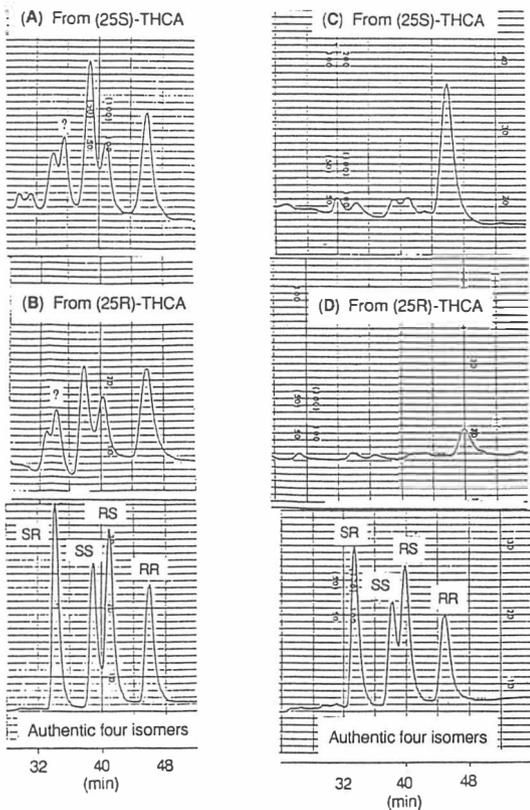


Fig.6 HPLC analysis of TeHCA(3) formed upon incubation of (25S)- and (25R)-THCA(2) (A) and (B): With mitochondrial fr.; (C) and (D) with 700g sup. Analysis was performed in the form of p-bromophenacyl ester, using an ODS column with MeOH-H₂O system as an eluting solvent.

が生成するのかを調べた。

まず、ラット肝のミトコンドリア分画を用いて NAD 非存在下で (25R)- および (25S)-THCA をインキュベートし生ずると考えられる TeHCA を p-プロモフェナシルエステル誘導体として HPLC にてしらべたところ、4種の TeHCA 異性体がいずれも確認された (Fig.6)。また、このインキュベーションで Δ^{24} -THCA も生じていることが認められた⁷⁾。

次に、700g 上清を用いて NAD 非存在下で同様な実験を行った。Fig.6 に示すとおり、(24R, 25R)-TeHCA が主に生成することがわかった。Crude な無細胞酵素系で (24R, 25R) 体が得られ

るという結果は他のグループによっても報告されている⁸⁾。

THCA の 25 位の立体異性体のうちいずれが代謝されるのかに関しては、われわれの上記の結果は両異性体とも変換されることを示している。最近、同様な趣旨の報告がなされた。

[27-¹³C]-THCA のインキュベーションでは、25S 体 (δ 17.55) の方が 25R 体 (δ 17.75) より多く回収される。

2 / 3. 4. 2. (E) および (Z)- Δ^{24} -THCA のインキュベーション

Δ^{24} -THCA には (E) 体および (Z) 体がある。このうちいずれがコール酸に変換されるかをラット肝の無細胞酵素系で調べた。

NAD を添加して (E) 体をインキュベートすると TeHCA の生成は認められず、コール酸の生成が確認された。しかしながら、(Z) 体からは TeHCA、コール酸の生成はともに認められなかった。現在、得られた TeHCA の立体化学について THCA を基質とした場合と同様な結果か否か確認しているところである⁷⁾。

2 / 3. 5. ハイブリッド基質、27-nor-THCA および Δ^{24} -27-nor-THCA の代謝物

脂肪酸の β 酸化では、3S の立体配置を有する β -ヒドロキシカルボン酸が中間体であることが知られている。今回の 24R, 25R 体とは β 位の立体化学が R であり脂肪酸の場合と逆である。そこで、THCA の炭素を一つ取った、27-nor-THCA および Δ^{24} -27-nor-THCA (14 および 15) を合成し、これから生じる 27-nor-TeHCA (16) の立体化学を調べてみるのは脂肪酸の β 酸化の酵素系と胆汁酸生合成系の酵素系の比較の点から大変興味深い。

まず、これらがラット肝の無細胞酵素系 (ミトコンドリア画分, NAD 添加) で基質となり得るかを調べ、(14) は 7.7% (15) は 17.5% の収率で cholic acid に変換されることを示した。この変換率はむしろ対応する THCA 等よりもよい値であった。

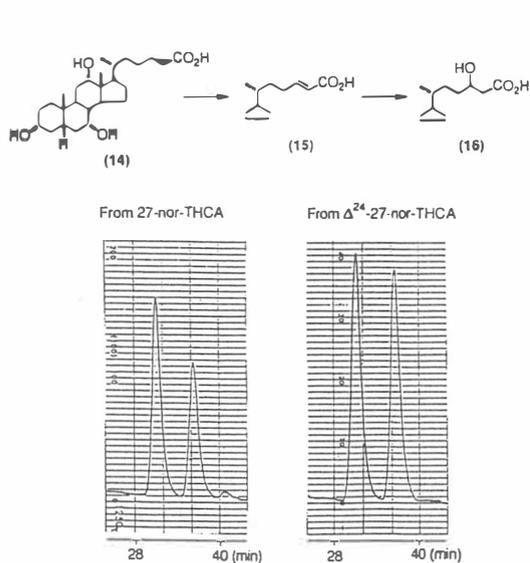


Fig.7 HPLC analysis of 27-nor-TeHCA(16) formed upon incubation of 27-nor-THCA (14) and Δ^{24} -27-nor-THCA(15) with mitochondrial fr. Analysis was performed in the form of p-bromophenacyl ester, using an ODS column with MeOH-H₂O system as an eluting solvent. Authentic(24S)-and(24R)-27-nor-TeHCA were eluted at 29.0 and 36.4 min, respectively.

27-nor THCA を、ラット肝無細胞酵素系のミトコンドリア分画を用いNAD非存在下にインキュベートしたところ、Fig.7に示すように24位の2つの異性体27-nor-TeHCA(16)が共に生成することがわかった。これはTHCAを基質とした場合に見られる結果と同様である⁹⁾。

700g上清によるインキュベーションは現在検討中である。

4. 考 察

胆汁酸の生合成における β 酸化類似のC-C結合切断反応に関して有機化学的立場から種々検討を加えた。

今までに行われていた放射性同位元素¹⁴Cによるトレーサー実験でなく、安定同位元素¹³Cによるトレーサー実験を初めて胆汁酸の生合成の研究に導入した。通常の実験室で放射能による汚染を

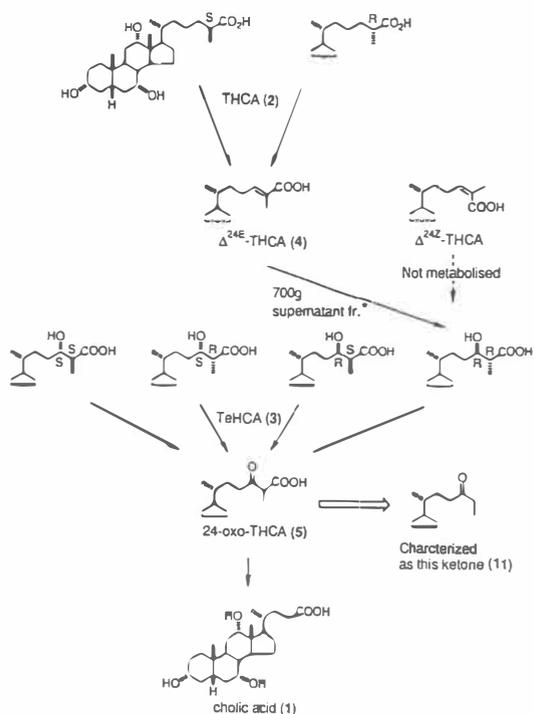


Fig.8 Summary of the Present Work

*When mitochondrial fr. was employed, four stereoisomers of TeHCA were formed.

気にすることなく実験を行うことができる以外に、代謝物を分離することなく、¹³C-NMRにより生成物の構造を調べることができる。この利点を生かして、今まで未報告の24-oxo-THCAが Δ^{24} -THCAから生成することを間接的に示すことができた。

なお、27-nor-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-24-oneについて、ウシガエルの胆嚢から単離の報告があるが¹⁰⁾、24-oxo-THCAから2/3.3.に示したように化学的分解により生じたものと考えられる。

最近、この β 酸化様反応の酵素学的研究が進歩しつつあり、脂肪酸分解系の酵素との比較の議論が可能になりつつある^{1b)}。例えば、bile acid CoA ligase(ミトコンドリアに存在)やbile acid oxidase(ペルオキシゾームに存在)は palmitoyl-CoA ligaseやfatty acid oxidaseとは異なるものであるとか、bifunctionalなbile acid hy-

dratase/dehydrogenase (ペルオキシゾームに存在)はfattyacid peroxisomal β -oxidation 酵素と似通ったものであるとか、thiolase(ペルオキシゾームに存在)は脂肪酸thiolaseと同一のものであるとか言われている。

我々は、基質および代謝中間体の化学的構造に基づいて酵素の性質を比較を試みようとするものである。ここに示した結果で、注目すべきは知見は：

- 1) ミトコンドリア分画および700g上清を用いたときの生成するTeHCAの立体化学が明らかに異なることである。
- 2) 700g上清を用いたときに生成するTeHCAは24R, 25R体であり、脂肪酸における β -ヒドロキシ酸(3S)と水酸基の立体化学が反対であることである。

この事実はhydratase酵素の反応における立体的要因に、胆汁酸と脂肪酸では差異があることを示すものである。

この点について、さらに知見を得るために、胆汁酸と脂肪酸のハイブリッド基質27-nor-THCAについて調べた結果、やはりミトコンドリア分画では(24R)-および(24S)の2つの24-ヒドロキシ酸が生じることがわかった。

以上、ラット肝無細胞系において立体化学を考慮しつつ基質と生成物の関係(Fig.8)を明らかにしてきたが、今後は上に記した興味ある発見の原因をより精製した酵素系を用いた実験系で解きあかしていく必要がある。

引用文献

1) 最近の Review : a), I. Bjorkhem, J. Lipid

Res., 33, 455, (1992); b) D. W. Russell and K. D. R. Setchell, Biochemistry, 31, 4737(1992).

- 2) M. Morisaki, Y. Fujimoto and N. Ikekawa, 'Metabolic Aspects of Lipid Nutrition in Insects,' eds, T. E. Mittler and R. H. Dadd, Westview Press, Colorado, 1983. p.17; N. Ikekawa, M. Morisaki and Y. Fujimoto, Acc. Chem. Res., in press.
- 3) Y. Fujimoto, C. -S. Chen, A. S. Gopalan and C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 104, 4720(1982); idem, J. Am. Chem. Soc., 104, 4721(1982).
- 4) T. Kinoshita, M. Miyata, S. M. Ismail, Y. Fujimoto, K. Kakinuma, N. Ikekawa and M. Morisaki, Chem. Pharm. Bull., 36, 134(1988).
- 5) Y. Fujimoto, T. Kinoshita, I. Oya, K. Kakinuma, N. Ikekawa and M. Morisaki, Chem. Pharm. Bull., 36, 142(1988).
- 6) M. Yuri, M. Tokumoto, N. Hara, Y. Fujimoto, N. Kobayashi and M. morisaki, Chem. Pharm. Bull., in press ;由利正利, 徳元真理絵, 原典行, 藤本善徳, 小林典子, 森崎益雄, 日本薬学会第113年会(大阪)発表。
- 7) 小林典子, 宇都宮禎子, 平賀伴子, 森崎益雄, 大谷いずみ, 藤本善徳, 日本薬学会第13年会(大阪)発表。
- 8) M. Une, I. Morigami, K. Kihira and T. Hoshita, J. Biochem., 96, 1103(1984).
- 9) Y. Fujimoto, unpublished work.
- 10) Y. Noma, M. Une, K. Kihira, M. yasuda, T. Kuramoto and H. Hoshita, J. Lipid. res., 21, 339(1980).