

氏 名(本籍) ^{やま}山 ^{ぐち}口 ^{とし}敏 ^{やす}康

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 353 号

学位授与年月日 昭和 61 年 7 月 17 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 水産学専攻

学位論文題目 水産生物のステロールに関する研究

論文審査委員 (主 査)

助教授 秦 正 弘 教授 野 村 正

教授 藤 尾 芳 久

論文内容要旨

I 植物プランクトンのステロール組成について

珪藻および渦鞭毛藻のステロール組成について分析を行った。珪藻として *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros didymus*, *Thalassiosira decipience* の4種、渦鞭毛藻として *Prorocentrum micans* について分析した。珪藻のステロール組成は炭素数27個から成るものから30個のものまで多様性に富んでいた。また、種によって異なるステロール組成を示し、特に主成分が異なることが示された。*S. costatum* では 24-methylene cholest-5-enol (45.1%), *C. gracilis* では cholest-5-enol (61.9%), *C. didymus* では 24-ethylidene cholest-5-enol (62.2%), *T. decipience* では 24-methyl cholest-5-enol (60.2%) がそれぞれ主成分であった。*P. micans* のステロールも炭素数27個から30個のものまで6成分が存在した。Cholest-5-enol (28.8%) を主成分としたが、他に渦鞭毛藻特有の4メチルステロールである、4,23,24-trimethyl cholest-22-enol, 4,23-dimethyl cholest-22-enol, 等が存在した (Fig. 1)。今回分析した植物プランクトンには C₂₆ ステロールが存在しなかった。植物プランクトンは、ステロール側鎖の代謝において種によって異なる能力を保持しているものと考えられる。この結果を Table 1 に示した。

II 海藻のステロール組成について

分析したすべての紅藻で cholest-5-enol を主成分としていたが、他のステロールとして C₂₈, C₂₉ ステロール等を含んでいた (Table 2)。テングサ目に属する *Gelidium amansii*, *Pterocladia tenuis* は非常に複雑なステロール組成を示し、*G. amansii* で21種、*P. tenuis* で18種のステロールが同定され、C₂₆ ステロール 24-nor-cholesta-5,22-dienol, 24-nor-cholesta-7,22-dienol, 24-nor-cholest-5-enol が同定された。(Table 3) 緑藻として *Ulva* sp. 1種を分析した (Table 4)。C₂₇ ステロールより C₃₀ ステロールが存在し、その主成分は (24Z)-24-ethylidene cholest-5-enol であることを、100 MHz ²H-NMR および ¹³C-NMR によって同定した。褐藻におけるステロールは、すべての種で (24E)-24-ethylidene cholest-5-enol を主成分とし、他に 24-methylene cholest-5-enol, cholest-5-enol を含むことが認められた (Table 5)。

褐藻および緑藻の主ステロールとして 24-ethylidene cholest-5-enol が存在した。褐藻に存在する (24E) 体は最終代謝産物として存在するが、緑藻に存在する (24Z) 体は、陸上高等植物の主成分である sitosterol の中間代謝産物であるが、緑藻ではそれ以後の代謝経路が発達しなかったものと考えられた。紅藻は C₂₇ ステロールを主成分とする唯一の植物である。ステロール C₂₄ 位のアルキル化は、植物における最初の閉環化合物である cycloartenol のシクロプロ

パンリングの開環に先だつものとされ、紅藻が他の海藻と比べ進化的に早い時期に分化したことを示しているものとも考えることもできる。珪藻は同じ植物門内で種によるステロール組成の相違が著しいことが特徴的であり、同植物門内でのステロール合成系の進化と他の性質との関連が興味深い。C-24 ethylidene cholest-5-enol 生合成において立体的制限機構をもたず、(24 E), (24Z) 相方を生合成している。渦鞭毛藻はステロール側鎖C-24位に加えてC-23 位をメチル化する機構をもつ。4 α -メチルステロールが多く存在することはC-4位における第2の脱メチル化の活性が低いものとも考える。以上をもとめて今回分析した植物のステロール側鎖代謝経路を仮定した (Fig. 2)。

Ⅲ 海水中に存在するステロールについて

表層海水よりステロールを抽出し、GLC および GC-MS で分析をした。ステロールとして cholest-5-enol および 24-ethylcholest-5-enol が同定された。

Ⅳ 軟体動物のステロールについて

貝類のステロール組成を分析した。斧足類として *Chlamys ferreri akazara*, *Crassostrea gigas*, *Tapes japonica*, *Corbicula leana*, 腹足類として *Neptunea arthritica* のステロール組成を分析した。斧足類は *C. leana* を除いて C₂₆ ステロールが存在した。主成分は Cholest-5-enol であるが、他の成分として C₃₀ ステロールまで複雑なステロール組成を示した。腹足類 *N. arthritica* は C₂₆ ステロールから C₂₉ ステロールまで存在し、主成分は cholest-5-enol (63.0%) であった。海産無脊椎動物に広範に分析する C₂₆ ステロールは淡水産 *C. leana* に検出されなかった (Table 6, 7)。

ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) のステロール組成を分析した (Table 8)。分離方法として硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィーを試みた。同定は GLC, GLC-MS によって行った。ホタテガイより同定されたステロールは、ほとんど植物プランクトンにみられるステロールであるが、24-nor-cholesta-5, 22-dienol および 27-nor-cholesta-5, 22-dienol は植物プランクトンに報告がなく、ホタテガイによる生合成ないし外因性ステロールの変換によるものと考えられる。同様に cholesta-5, 22-dienol も植物には少なく、その起源は生合成ないし変換によるものと考えられた。ホタテガイのステロールは食餌起源のステロールをよく反映していると考えられる。

V ホタテガイのステロール生合成能について

ホタテガイのステロール合成能を明らかにすることを目的として放射性同位元素を用いたトレーサー実験を行った。〔1-¹⁴C〕酢酸を投与した実験で、ホタテガイは酢酸を脂肪成分にとりこむことが可能であることをラジオ薄層クロマトスキャナー、オートラジオグラムを用いて確認した (Table 9)。不けん化物に対するメタノール沈澱法を繰り返す、再結晶への放射能とりこみを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、ホタテガイのステロール生合成能を確認した。さらに硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィーで分離、放射能を測定することで、cholest-5-enol, および 24-methylene cholest-5-enol へのとりこみを認め、生合成を確認した。ホタテガイに24アルキル化能の存在が示唆された。

VI ホタテガイのステロール変換能について

ホタテガイに ¹⁴Cで標識した cholesterol, sitosterol, fucosterol を投与しトレーサー実験を行った。Fucosterol はワカメに〔¹⁴C-methyl〕-メチオニンを投与し、24エチリジン基の炭素を標識し代謝実験に用いた。投与後のステロールは、硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィー、分取ガスクロマトグラフィーで分離された。Cholesterol から cholesta-5,22-dienol, 24-methylcholesta-5,22-dienol に変換され、ごく微かであるが 24-nor-cholesta-5,22-dienol ピークに放射能が存在した。このことより cholesterol のアルキル化、脱水素化が示された (Table 10, 11)。Sitosterol から (24Z)-ethylidene cholest-5-enol, (24E)-ethylidene cholesterol, 24-methylcholest-5-enol, cholest-5-enol への変換が明らかになった (Table 12, 13, 14)。また fucosterol より (24Z)-ethylidenecholest-5-enol, 24-nor-cholesta-5,22-dienol へ変換されることが示された (Table 15, 16, 17)。

ホタテガイはステロール生合成能を有することが認められたが、その能力は限られ、そのステロール組成は食餌起源のステロールを直接または生体内で変換した結果であると考えられる。海産無脊椎動物に広範に存在する C₂₆ ステロールのひとつの起源として植物ステロールの生体内変換に因る経路が示された (Fig. 3)。

VII 要約

- 1) 珪藻のステロールは、種によって主成分が異なり、その組成は複雑であった。
- 2) 海産植物のステロール組成から、側鎖代謝経路の発達を考察した。
- 3) 海産植物より3種類の C₂₆ ステロールを同定した。
- 4) ホタテガイが酢酸よりステロールを生合成できることを示した。

5) ホタテガイのステロール変換能を調べ、側鎖22位への二重結合の導入、および側鎖脱アルキル化が可能であることを示した。C₂₆ ステロールの合成経路として fucosterolの生体内変換を明らかにした。

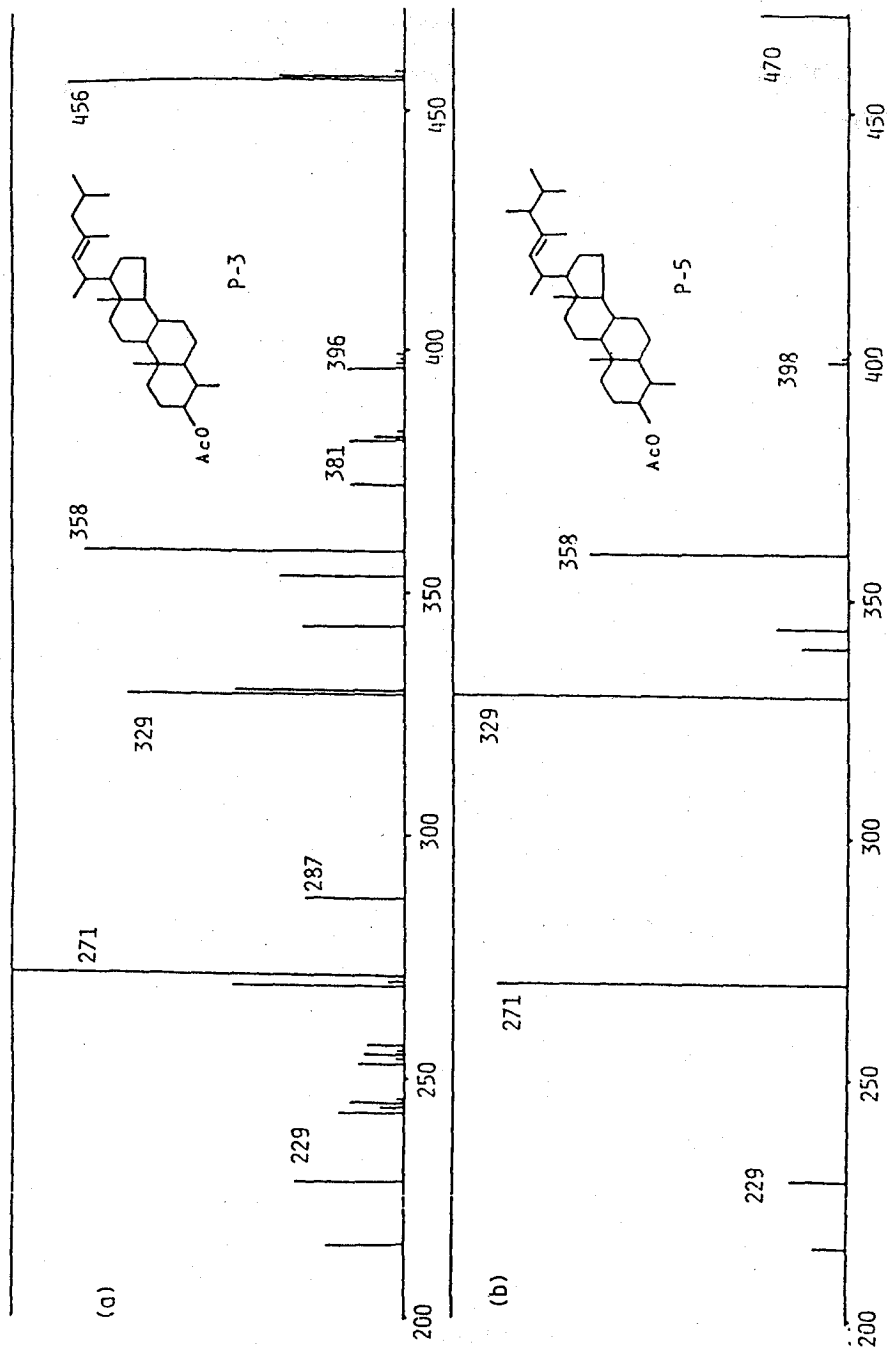


Fig. 1 Mass spectra of (a) acetylated 24-demethylidinosterol and (b) acetylated dinosterol

Table 1 Sterol composition of some marine phytoplanktons determined by GLC (%)

Sterols	<u>S. costatum</u>	<u>C. gracilis</u>	<u>C. didymus</u>	<u>T. decipience</u>	<u>P. micans</u>
Cholesterol	15.1	61.9	18.8	5.9	28.8
24Methylcholesta-5,22-dienol	----	4.4	----	----	8.6
Desmosterol	14.7	----	----	----	----
24Demethyl-dinosterol	----	----	----	----	20.9
24Methylcholest-5-eno1	----	4.7	----	60.2	----
24Methylencholest-5-eno1	45.1	----	----	----	----
23,24Dimethyl-cholesta-5,22-dienol	----	----	----	----	14.2
Dinosterol	----	----	----	----	14.5
24Ethylcholest-5-eno1	5.8	4.5	19.0	13.4	----
Fucosterol	5.5	11.3	62.2	14.1	----
4,23,24Trimethyl-cholest-5-eno1	----	----	----	----	10.9
Unknown	13.8	13.2	----	6.4	----

Table 2 The sterol composition of the red algae (Rhodophyta)

	C27 Δ 5,22	C27Δ5	C28Δ5,22	C27Δ5,24	C28Δ5	C28Δ5,24(28)	C29Δ5	C29Δ5,24(28)
RRT*	0.92	1.00	1.12	1.18	1.28	1.32	1.55	1.72
Order								
Cryptonemiales								
<u>Neodilsea yendoana</u>	—	98%	1	tr	—	—	1	—
<u>Grateloupia turuturu</u>	—	94	6	—	—	—	tr	—
<u>Gloipeltis furcata</u>	tr	97	tr	2	—	—	tr	1
Gigartinales								
<u>Chondrus ocellatus</u>	tr	92	1	2	2	—	tr	3
<u>Gracilaria verrucosa</u>	—	79	13	6	—	—	2	tr
Bangiales								
<u>Porphyra sp.</u>	tr	73	tr	9	1	1	1	11

Table 3 Mass spectral data for the acetate of C₂₆ sterols

Fragmentation*	C26Δ5,22	C26Δ22	C26Δ7,24
Molecular ion	—————	414(14)	412(16)
M-CH ₃ (15)	—————	399(6)	397(15)
M-AcOH(60)	352(100)	354(6)	352(10)
M-15-60	337(16)	—————	337(10)
M-side chain-2H	—————	—————	313(55)
M-s.c.**-60	255(91)	257(100)	255(100)
M-s.c.-60-2H	253(45)	—————	253(26)
M-s.c.-42	—————	—————	273(16)
M-s.c.-42-60	213(24)	215(25)	213(47)
M-s.c.-27	—————	—————	288(23)
M-s.c.-27-AcO	229(10)	—————	229(47)
M-cleavage at C20,22-H	—————	344(28)	342(15)
M-cleavage at C20,22-15-H	—————	329(16)	—————
M-cleavage at C20,22-60-H	282(9)	284(9)	—————
M-cleavage at C20,22-15-60-H	—————	269(7)	—————

* m/e (%)

** side chain

Table 4 Composition of sterol mixture from *Ulva* sp.

PEAK	RRT*	PERCENTAGE COMPOSITION.	COMPONENT
1	1.00	5.0%	colest-5-enol
2	1.19	1.0	cholesta-5,24-dienol
3	1.33	1.9	24-methylenecholest-5-enol
4	1.58	2.7	24-ethylcholest-5-enol
5	1.81	88.3	24-ethylidenecholest-5-enol
6	1.90	1.1	24-propylidenecholest-5-enol
7	2.07	tr	unknown
8	2.18	tr	unknown

*relative retention time to cholesterol

Table 5 The sterol composition of brown algae

Order	cholest-5-enol	24-methylene-cholest-5-enol	24-ethylidene-cholest-5-enol	other sterol
Chordariales				
<u>Heterochordaria abientina</u>	1.4%	5.4%	89.8%	3.4%*
Fucales				
<u>Sargassum fulellum</u>	5.6	6.9	87.5	—
<u>Hizikia fusiforme</u>	—	9.1	90.9	—
Laminariales				
<u>Laminaria japonica</u>	1.5	13.8	84.6	—
<u>Laminaria religiosa</u>	0.7	15.1	83.5	0.7 **
<u>Eisenia bicyclis</u>	—	12.0	88.0	—
<u>Undaria pinnatifida</u>	3.6	17.0	79.4	—

* propylidenecholest-5-enol

**cholesta-5,24-dienol

- 1: red algae
- 2: dinoflagellates
- 3: brown algae
- 4: green algae
- 5: higher plants

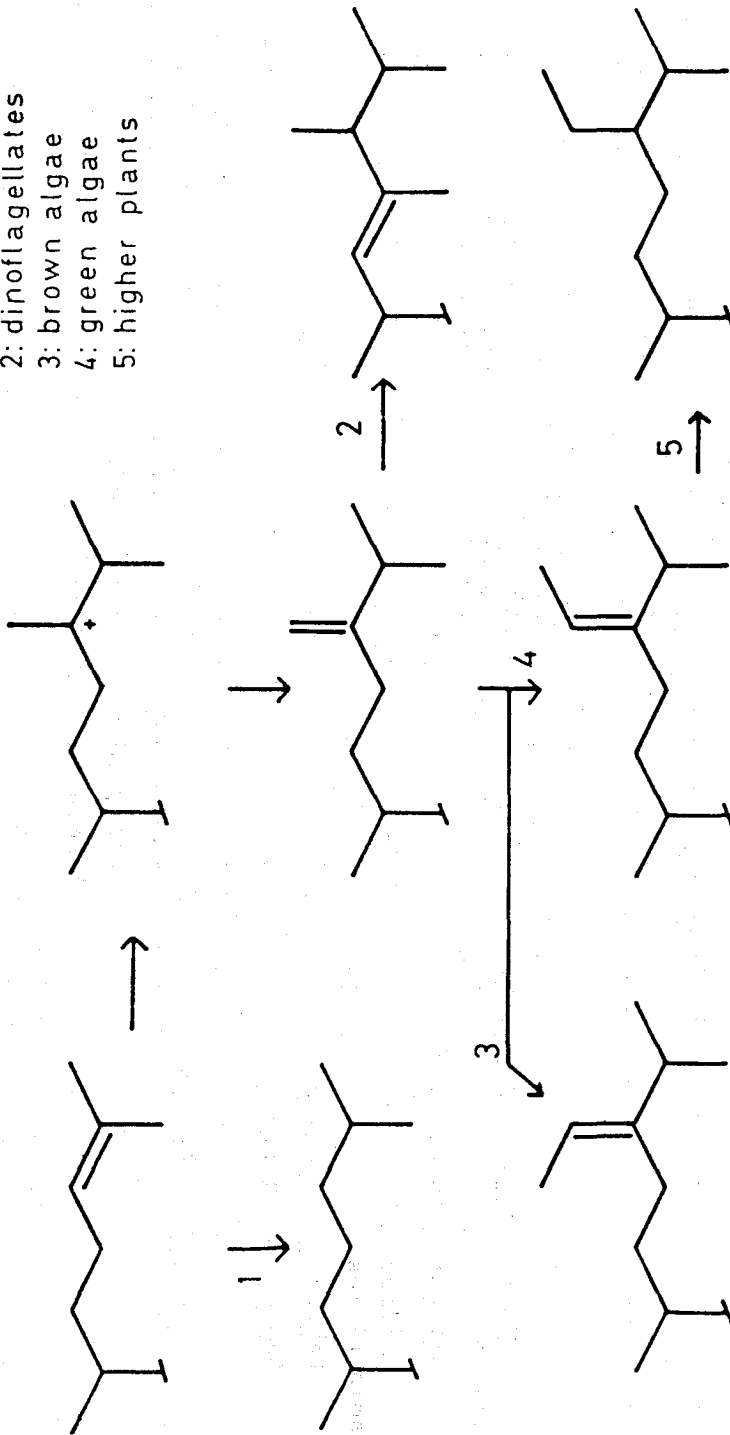


Fig. 2. Metabolic pathway of major sterol in each plant.

Table 6 Relative retention time of sterol on GLC

Peak No.	RRT	Trivial name	Systematic name
1	0.65	(C ₂₆ sterol)	24-norcholesta-5,22-dienol
2	0.92	22-dehydro- cholesterol	cholesta-5,22-dienol
3	1.00	cholesterol	cholest-5-enol
4	1.12	brassicasterol	24-methylcholesta-5,22-dienol
5	1.29	24-methylene- cholesterol	24-methylenecholest-5-enol
6	1.37	stigmasterol	24-ethylcholesta-5,22-dienol
7	1.53	sitosterol	24-ethylcholest-5-enol
8	1.61	fucosterol	24-ethylidenecholest-5-enol
9	1.76	isofucosterol	24-ethylidenecholest-5-enol
10	1.97	(C ₃₀ sterol)	

Table 7 Sterol composition of the shellfishes determined by GLC

Peak No.	<u>Chlamys</u>	<u>Crassostrea</u>	<u>Tapes</u>	<u>Colbicula</u>	<u>Nepturea</u>
1	4.8%	6.7	4.7	—	5.7
2	—	17.0	7.4	—	6.1
3	49.1	35.4	35.9	55.2	63.0
4	15.8	15.0	14.6	11.9	6.1
5	18.8	14.9	18.2	19.4	10.9
6	—	—	4.5	8.9	—
7	6.3	—	9.8	4.6	6.3
8	4.7	5.7	—	—	1.9
9	0.5	5.3	4.9	—	—
10	trace	trace	trace	—	—

Table 8 Composition of the sterol mixture from *Patinopectene yessoensis*

Peak	RRT*	Percentage composition	Component
1	0.66	4.7 %	24-norcholesta-5,22-dienol
2	0.88	5.5	27-nor-24-methylcholesta-5,22-dienol
3	0.93	9.9	cholesta-5,22-dienol
4	1.00	36.3	cholest-5-enol
5	1.16	11.8	24-methylcholesta-5,22-dienol
6	1.30	21.1	24-methylenecholest-5-enol
7	1.57	6.8	24-ethylcholest-5-enol
8	1.72	3.9	24-ethylidenecholest-5-enol
9	1.95	trace	24-propylidenecholest-5-enol

Table 9 Proportional distribution of radioactivity in the lipid fraction after injection of radioactive acetate

Lipid fraction	distribution of radioactivity		
	2day	5day	10day
PL+MG	76.1%	81.8%	80.1%
DG	1.5	2.3	1.2
S	1.3	2.2	1.4
FFA	5.5	5.4	6.5
TG	14.6	7.4	9.0
HC+SE	1.0	0.9	1.8

PL:polar lipids, MG:monoglycerides,
 DG:diglycerides, S:sterols,
 FFA:free fatty acids, TG:triglycerides,
 HC:hydrocarbons, SE:sterol esters,

Table 10 Distribution of radioactivity in the sterol fraction after injection of radioactive cholesterol

Acetylated sterol fraction *	Distribution of radioactivity
I	1048113 dpm
II	19535
III	2032
IV	25304
V	2856
VI	3524

*Separated by AgNO_3 -TLC

I :cholesterol

II :24-methylcholesta-5,22-dienol

Table 11 Distribution of radioactivity of the Fr. IV after injection of radioactive cholesterol

Sterol peak*	Distribyion of radioactivity
Fr. IV-(1)	558 (dpm)
(2)	24056
(3)	70

*separater by preparative GLC

Fr. IV-(1) : 24-nor-cholesta-5,22-dienol

(2) : cholesta-5,22-dienol

Table 12 Distribution of radioactivity on sterol fraction
after injection of radioactive sitosterol

Fraction*	6 h	12 h	24 h	48 h
I	18342 dpm (81.8%**)	34738(88.6)	28782(85.7)	37256(85.4)
II	1469 (6.6)	1515(3.9)	1882(5.6)	2216(5.1)
III	338 (1.5)	589(1.5)	325(1.0)	640(1.5)
IV	217 (1.0)	488(1.2)	248(0.7)	257(0.6)
V	1763 (8.0)	1741(4.4)	2129(6.3)	3062(7.0)
VI	266 (1.2)	117(0.3)	216(0.6)	195(0.4)

* Separated by Ag NO₃-TLC

** Percentage to total radioactivity

Table 13 Distribution of radioactivity in the Fr. I after injection
of radioactive sitosterol

Sterol peak	Distribution of radioactivity	
1	2094 dpm	1102 dpm/mg
2	3658	12193
3	983	3276
4	94065	316550

Separated by preparative GLC

1:cholesterol
2:24-methylcholesterol
3:24-ethylcholesta-5,22-dienol
4:sitosterol

Table 14 Distribution of radioactivity in the Fr. V after injection of radioactive sitosterol

Sterol peak	Distribution of radioactivity	
1	207 dpm	1035 dpm/mg
2	110	550
3	76	760
4	1542	15420
5	2071	4142

Separated by preparative GLC

4: fucosterol
5: isofucosterol

Table 15 Distribution of radioactivity in the sterol fraction isolated from the scallop after injection of radioactive fucosterol

Acetylated sterol fraction*	Distribution of radioactivity
Fr. I	254 dpm
II	959
III	37269
IV	165707
V	5652
VI	5216

* Separated by AgNO₃-TLC

Table 16 Distribution of radioactivity in the Fr. III after injection of radioactive fucosterol

Sterol peak*	Distribution of radioactivity	
Fr. III-(1)	1095 dpm	842 dpm/mg
(2)	988	705
(3)	61	610
(4)	152	760
(5)	32826	32826
(6)	914	9140

* Separated by preparative GLC

(5) fucosterol
(6) isofucosterol

Table 17 Distribution of radioactivity in the Fr. IV after injection of radioactive fucosterol

Sterol peaks*	Distribution of radioactivity	
Fr. IV-(1)	2242 dpm	2802 dpm/mg
(2)	1176	11760
(3)	617	2057
(4)	511	5110
(5)	60857	35798
(6)	1124	11240

* Separated by preparative GLC

(1) 24-norcholesta-5,22-dienol
(2) C27 sterol
(5) fucosterol
(6) isofucosterol

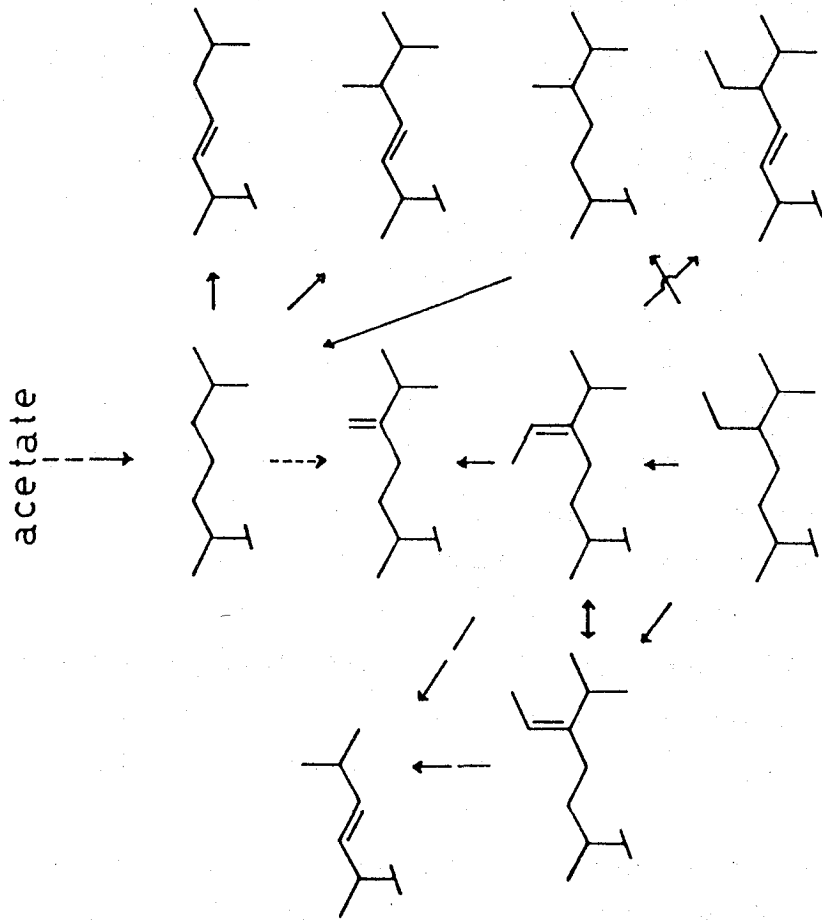


Fig. 3 Sterol side chain metabolism in scallop

審査結果の要旨

ステロール組成は生物種によって特徴があり、なかでも軟体動物は複雑な組成を示すことで知られている。ステロール組成は内因性、外因性ステロールの代謝によって決定されるが、軟体動物のステロール代謝についてはいまだに不明の点が多い。

本研究は軟体動物海産二枚貝に広く存在するC26ステロール(24-ノルコレスター5, 22-デエノール)の起源を明らかにする目的で行われた。著者は、まず、貝類のステロールを分析し、C26ステロールが海産二枚貝に分布することを確認した後、食餌性C26ステロールの寄与をみるために植物プランクトン5種、褐藻7種、紅藻6種、緑藻1種を分析し、褐藻はフコステロール、紅藻はコレステロール、緑藻(あおさ)はイソフコステロールを主とすること、植物プランクトン(珪藻、渦鞭毛藻)の主ステロールは種により大きく異なること、C26ステロールは紅藻に少量存在するのみであることを明らかにした。また、海水中のステロールとして、コレステロール、シトステロールを同定した。以上の結果より、海産二枚貝C26ステロールは食餌性C26ステロールに由来する可能性の少ないことを明らかにした。

次に著者は、海産二枚貝のモデル生物としてホタテガイをとりあげ、 ^{14}C アセテートを投与し、ホタテガイにおけるステロール生合成能を調べ、コレステロール、24-メチレンコレステロールへの ^{14}C の取り込みを認めたが、その生合成能は非常に低いことを明らかにした。

次に著者は、 ^{14}C -コレステロール、 ^{14}C -シトステロール、 ^{14}C -フコステロール、 ^{14}C -24-メチレンコレステロールをホタテガイに投与し、側鎖のアルキル化の存在を明らかにするとともに、C26ステロールは主としてフコステロールより、一部はコレステロールより生合成されることを明らかにした。また、24-メチレンコレステロールは他のステロールへ転換し難いことを明らかにした。

以上、本論文はホタテガイにおけるステロール代謝の新知見を得るとともに、二枚貝におけるステロール組成が代謝変換能と食餌性ステロール組成によって決定されることを明らかにしたものであり、農学博士の学位を授与するに値すると判断した。