

氏名(本籍) あん じょう たか こ
安 生 孝 子

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬 第 171 号

学位授与年月日 昭和53年 7月13日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 ステロイドA環の化学的ならびに酵素
的変換に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 亀 谷 哲 治

教授 橋 本 嘉 幸

論 文 内 容 要 旨

性ホルモン、副腎皮質ホルモン、強心配糖体などのステロイド化合物は生理的、薬理的に重要な意味をもつものが多く、これらの立体構造と生理活性発現とは密接に相関することが知られている。一方、立体化学の目覚ましい進歩は関連分野における研究の発展を著しく促したが内因性ステロイドの生合成研究もまたその例外ではない。Testosterone, androstenedione などのC₁₉ステロイドは *in vivo* および *in vitro* で estrogen に変換される(酵素的芳香核化)が、その際みられるC-1, C-2水素脱離の立体化学は芳香核化機構とも関連して多大の関心がよせられている。排卵抑制剤、補充療法ホルモン剤として使用される19-norsteroid も内因性ステロイドと同様酵素的芳香核化をうける。しかし機構については未詳の点が多く、内因性ステロイドの芳香核化機構とも関連することからその解明が望まれる。また微生物による19-norandrostenedione の芳香核化はヒト胎盤によるそれとの比較において興味深いものがある。

特異な化学構造と生理活性をもつ天然の cardenolide はA/B環の結合形式がほとんど5 β -*cis*であり、5 α -*trans*体への異性化は化学反応としてのみならず生理活性の観点からも興味もたれる。また、cardenolide の構造活性相関に関してはすでに少なからず検討が加えられているが、A環の構造との関係については未だ不明の点が多い。

著者は以上の観点からまず19-norsteroid の酵素的芳香核化機構の解明を目的としてC-2水素を立体特異的に重水素ならびにトリチウムで標識した estr-4-ene-3, 17-dione を合成した。これらのうちトリチウム標識体を基質に用いヒト胎盤ならびに微生物による芳香核化におけるC-2水素脱離の立体化学を検討し、両者にみられる芳香核化機構の比較を行なった。

つぎに強心性ステロイドの5 β -A/B-*cis*構造を5 α -A/B-*trans*体に変換する一般法を確立し、本法を利用してさきにMaslerらが植物から単離した強心性ゲニン, syriogenin, の構造を決定した。また、A環修飾 cardenolide を合成し、その構造活性相関についても考察を加えた。

19-Norsteroid の酵素的芳香核化機構

トリチウム標識基質を合成するにあたってその基礎を確立するためまず19-norsteroid A環の立体化学を確立しつつ epimeric 2-deuterioestr-4-ene-3, 17-diones の合成を行なった。すなわち19-nortestosterone (1)をアルカリ性H₂O₂でエポキシ化後アセチル化して(2)とした。(2)をNaBH₄還元後常法通り mesylates (4)に導きDMF中Li₂CO₃と加熱して(6b), (7)とともにオレフィン(5)を得、ついで(5)をLiAlH₄還元が付して estr-2-ene-5 β , 17 β -diol (8)に誘導した。(8)を過酸化で処理して得た2 β , 3 β -epoxide (9)をLiAlH₄による環開裂反応に付すと3 β , 5 β , 17 β -triol (11a)が

生成した。(11a)は(2)を LiAlH_4 還元して得られた triol 体2種の中の1つと一致し、ホスゲンで処理するとき carbonate (13)を生成した。さらに(8)は

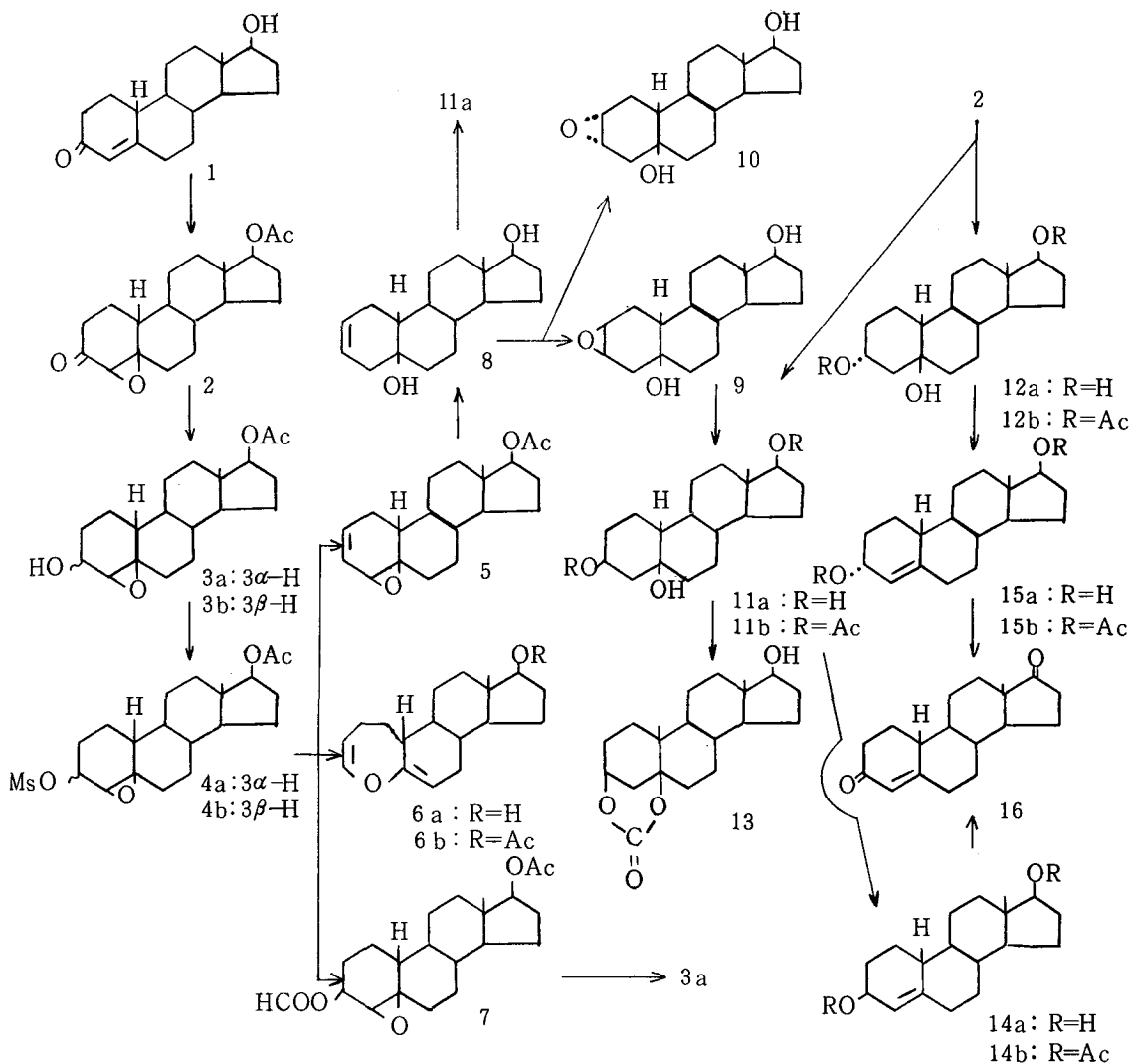


Chart 1 Ac=CH₃CO- Ms=CH₃SO₂-

B_2H_6 と反応させたのち H_2O_2 で酸化すると主成績体として (11a) を与えた。ここに得られた (11a) をアセチル化後ピリジン中塩化チオニルで処理すると C-4 の方向に脱水して (14b) を生じたが、このものは水解後 CrO_3 -ピリジンで酸化すると標品に一致する estr-4-ene-3,17-dione (16) を与えた。他方 (12a) も同様に (15b) を経て (16) に導くことができた。

以上の結果からみて triol (11a) の 2 α , 2 β 位にそれぞれ立体特異的に重水素が導入され

ば目的とする標識化合物の合成が可能となる。そこで (9) を LiAlD_4 で環開裂して 2α -deuterio 体 (20) とし, 他方 (8) に B_2D_6 を反応させて 2β 位を重水素化した (17) を製した。これら (17, 20) を前述同様順次アセチル化, 脱水, 水解, ついで酸化して epimeric 2-deuterioestr-4-ene-3, 17-diones (19, 22) を得た。両者はマスペクトルの解析からいずれも重水素含有率が98%以上であることが確認された。つぎに基質として必要な epimeric 2-tritioestr-4-ene-3, 17-diones を重水素標識法に準じて合成した。すなわち(9) を LiAl^3H_4 で処理して [2α - ^3H] 体 (26) に, 一方 (8) を B_2^3H_6 と反応させて [2β - ^3H] 体 (23) に導き, これらを前述同様に処理して epimeric 2-tritioestr-4-ene-3, 17-diones (25, 28) を得た。(25), (28) に [4 - ^{14}C] estr-4-ene-3, 17-dione を加えそれぞれ一定の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 値を示す [4 - ^{14}C -2- ^3H] 体を調製した。

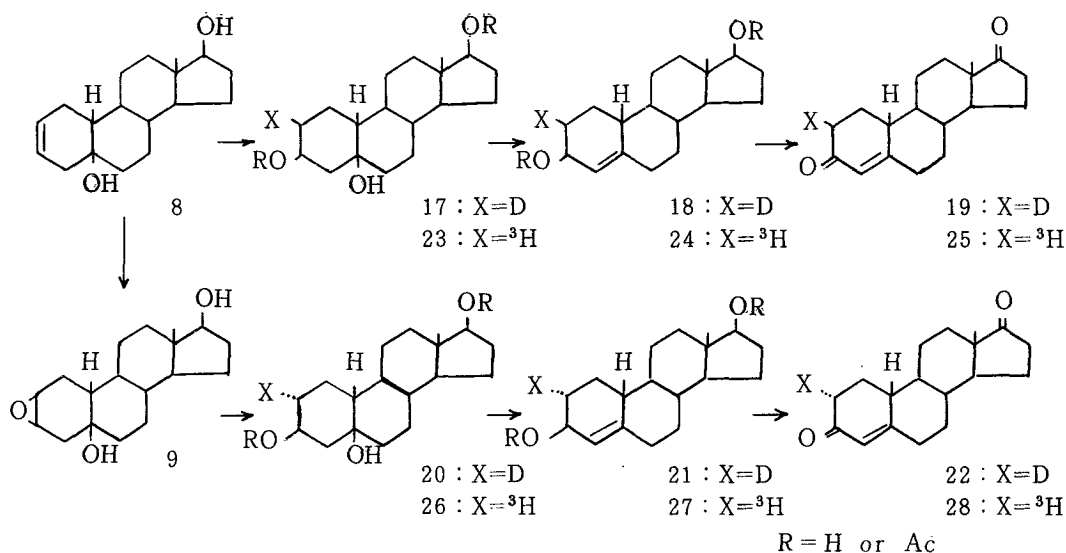


Chart 2

ここに得られた [4 - ^{14}C -2- ^3H] estr-4-ene-3, 17-dione を基質とし NADPH-generating system, O_2 の存在下ヒト胎盤 $10,000 \times \text{g}$ 上清と 37° , 60 min インキュベートした。生成物 (estrone, 1β -hydroxyestr-4-ene-3, 17-dione) および未反応の基質を preparative TLC にて分離精製後それぞれ carrier を加えて再結晶し, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 値を測定して Table I に示す結果を得た。すなわち 19 -norsteroid が estrone に変換される時 C-2 位からの水素脱離は 2β 水素に立体特異的であることが判明した。またこの際生成する 1β -hydroxy 体は C-2 水素の脱離が認められず, したがって Townsley らが提唱する機構におけるエノール中間体は否定された。回収された未反応基質についても C-2 水素の脱離がみられな

いことから仮に estrone の生成過程でエノール化がおこるとしてもそれは不可逆的であることが示唆された。

Table I Tritium Loss of Products and Substrates in Placental Aromatization

	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	% ^3H Lost
(2 β - ^3H) Estr-4-ene-3, 17-dione	37.6	
Estrone	8.0	79
1 β -Hydroxyestr-4-ene-3, 17-dione	29.2	
Recovered substrate	35.0	
(2 α - ^3H) Estr-4-ene-3, 17-dione	37.8	
Estrone	30.1	20
1 β -Hydroxyestr-4-ene-3, 17-dione	30.3	
Recovered substrate	35.6	

つぎに微生物による 19-norsteroid の芳香核化について同様の検討を試みた。すなわち前述の [4- ^{14}C -2- ^3H] estr-4-ene-3, 17-dione を基質に用い、*Bacillus sphaericus* と 30°, 48 hr インキュベート後生成する estrone を preparative TLC にて分離精製した。Carrier を加えて再結晶したその $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 値を測定して Table II に示す結果を得た。すなわちこの芳香核化に際し C-2 位からの水素脱離はヒト胎盤の場合と同様 2 β 水素に立体特異的であることが判明した。

Table II Tritium Loss of Products and Substrates in Dehydrogenation with *B. sphaericus*

	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	% ^3H Lost
(2 β - ^3H) Estr-4-ene-3, 17-dione	35.3	
Estrone	7.2	80
(2 α - ^3H) Estr-4-ene-3, 17-dione	36.4	
Estrone	32.5	11

芳香核化における C-1 位からの水素脱離の立体特異性はすでに Townsley ら, Brodie らにより明らかにされている。したがってヒト胎盤では 1 β , 2 β -*cis* 脱離, 一方微生物では 1 α , 2 β -*trans* 脱離と結論されるが両者間には異なる機構が関与しており興味深く思われる。

5 β -Cardenolide の 5 α -Cardenolide への変換と Syriogenin の構造

まず, digitoxigenin (29) および 3-oxo 体 (30) を p-cymene 中 Raney Ni で処理し異性化を試みたが目的は達せられなかった。つぎに, (30) を triglyme 中パラジウム炭の共存下加熱還流すると, 未反応の (30) および (32), (33), (34), (35) を与えた。(32) および

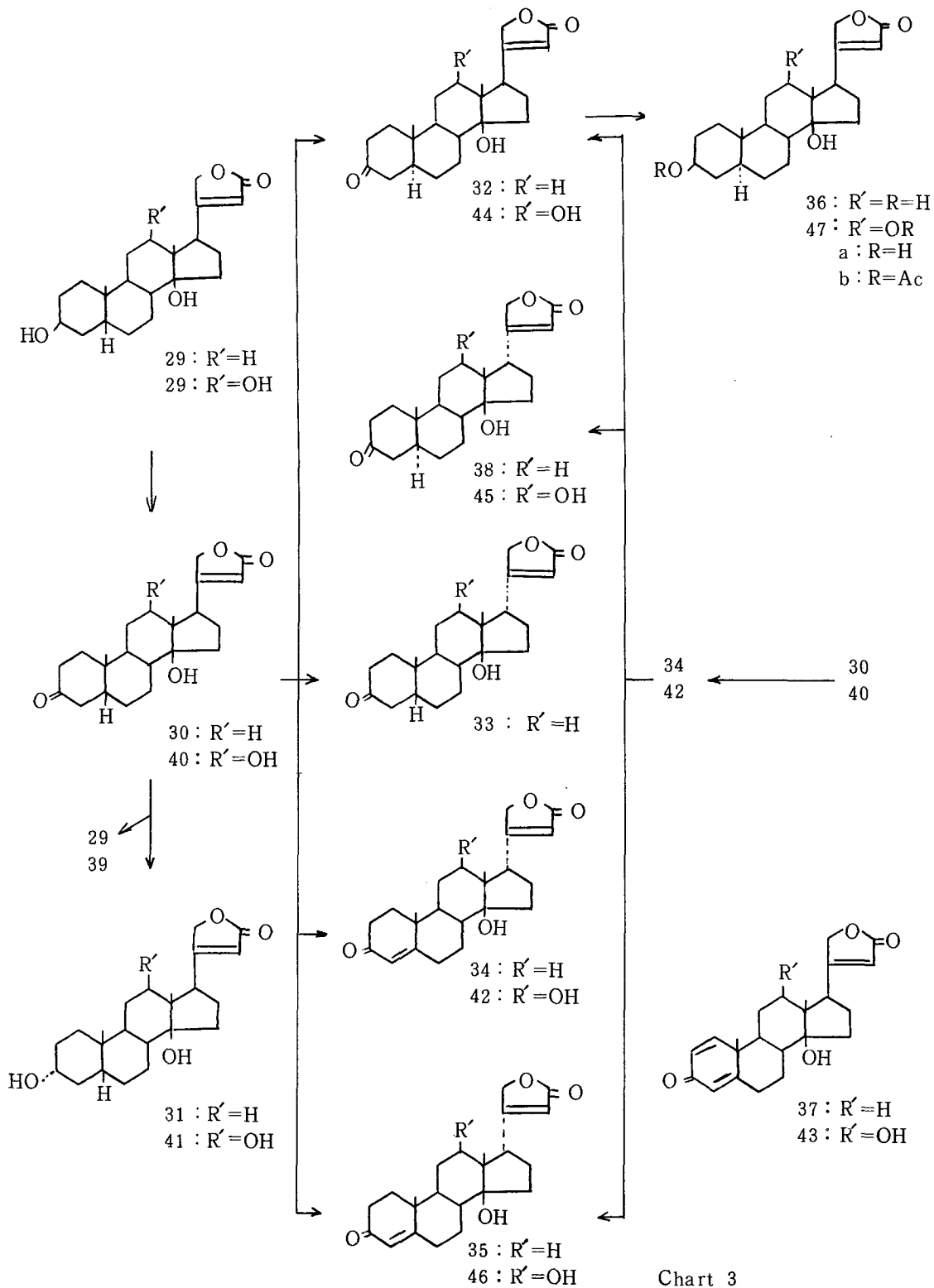
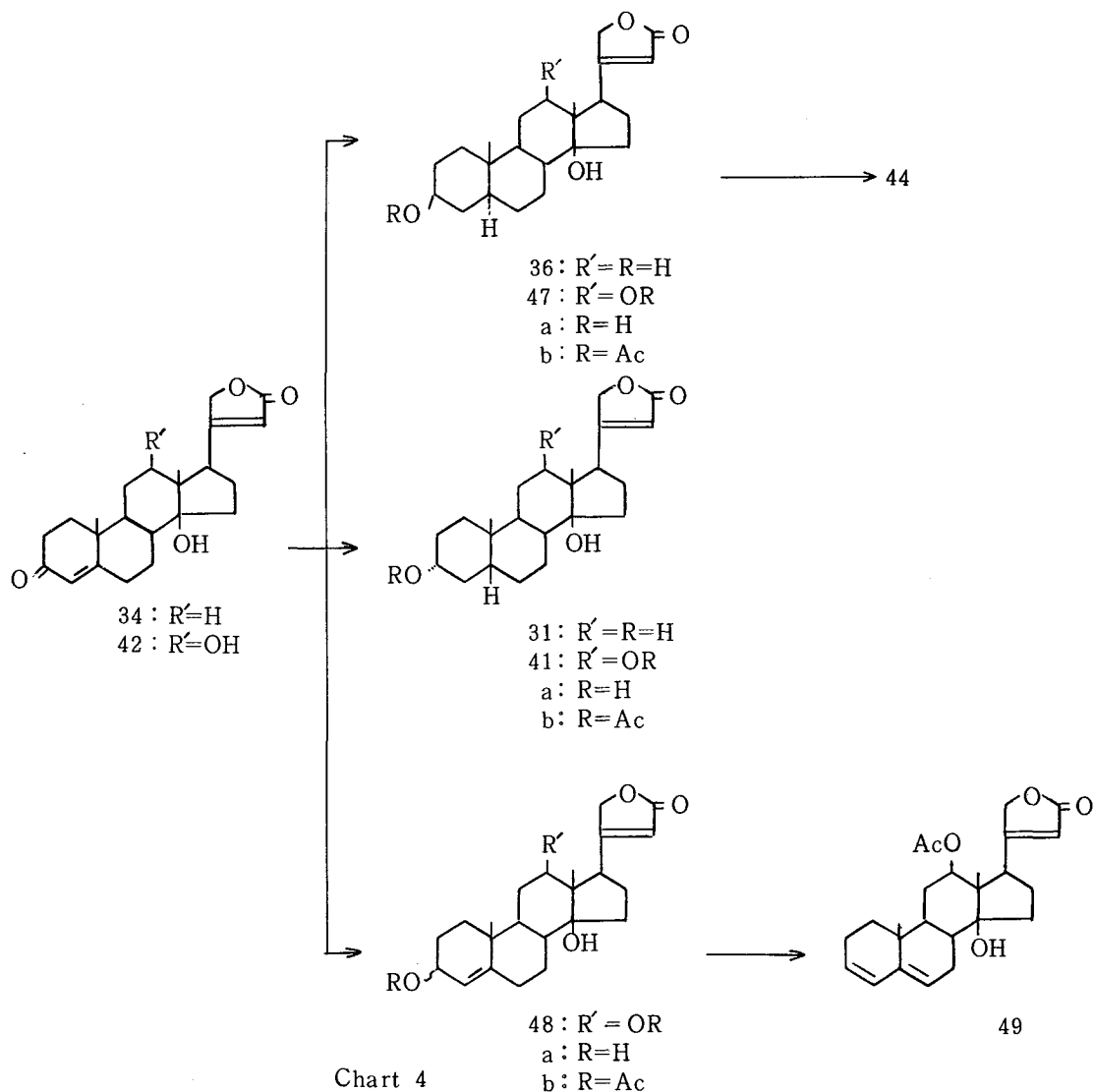


Chart 3

(30) は混合物のまま NaBH_4 還元で目的の uzarigenin (36) に導いた。この異性化反応における主成績体は (34) であり、これが (30) \rightarrow (32) の反応中間体と考えられることから、(34) を (30) と同様に処理したところ期待通り (32) が得られ、(35)、(38) が副生した。なお、17位側鎖の異性化は触媒の存在に関係なくおこり、熱力学的により安定な 17α 体を生成する。

ついで digoxigenin (39) から 2 工程で製した 3-oxo- 14^4 体 (42) を前述同様に処理して (44) を得、このものを NaBH_4 還元で付して目的の 5α -digoxigenin (47a) に導いた。しかし、前述の digitoxigenin 系化合物に比して 17位側鎖の異性化がおこりやすく (42) から (47a) への変換はきわめて低収率であった。

そこで Hauser らの方法 (ピリジン中 LiBH_4 で処理) を検討した。まず (34) を原料としてピ



リジ中 LiBH_4 で処理したところ (36) および (31) を与えた。つぎに (42) を同様に処理すると予期に反して (47a), (41a) および (48a) を生成し, 混合物のまま, さらにそのアセチル化物 (47b, 41b, 48b) について分離を試みたが目的は達せられなかった。そこでアセチル体の混合物を 1% H_2SO_4 で短時間加熱還流して (48b) を (49) に変換した後未変化の (47b) と (41b) を分離し, (47b) を水解して目的とする (47a) を得た。さらに (47a) を酸化して (44) に導き, その旋光分散を測定して (47a) の 5α 配置を確認した。

さきに Masler らにより報告された syriogenin は構造が不確実なまま残されていたが今回合成した 5α -digoxigenin と直接比較検討した結果両者は同一物であることが判明し, したがって syriogenin の構造は 5α -digoxigenin, すなわち 3β , 12β , 14 -trihydroxy- 5α , 14β -card-20(22)-enolide であることが確認された。

以上の結果 5β -A/B-*cis*-cardenolide の 5α -A/B-*trans* 体への変換は 2 つの方法により達せられることが判明した。すなわち triglyme 中パラジウム炭の共存下加熱還流する方法と, ピリジン中 LiBH_4 で処理する方法であり, 後者の方が有利と思われる。

以上のようにして得た 12 種の化合物の強心作用を Straub 法により検討した (Table III)。

Table III Cardiotonic Activities of the Cardenolides Derived from
Digitoxigenin and Digoxigenin

Digoxigenin - Series			Digitoxigenin - Series		
Compound (12β : OH)	C-contr.(g/ml)	RP(39=1.0)	Compound (12β : H)	C-contr.(g/ml)	RP (29=1.0)
47 a	10^{-5}	0.1	36	3×10^{-6}	0.1
39	10^{-6}	1.0	29	3×10^{-7}	1.0
40	3×10^{-6}	0.3	30	$3 \times 10^{-7} - 10^{-6}$	0.3 - 1.0
41	$(1-3) \times 10^{-5}$	0.03-0.1	31	$3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$	0.03 - 0.1
42	$3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$	0.1-0.3	34	$(1-3) \times 10^{-6}$	0.1 - 0.3
43	3×10^{-6}	0.3	37	$(1-3) \times 10^{-6}$	0.1 - 0.3

C-contr., concentration of the drug reached when systolic contracture of the heart took place

RP, relative potency

その結果, 5β -cardenolide の強心作用は対応する 5α 体の約 10 倍強いこと, A 環の化学修飾 (3α -OH, 3 -oxo, 3 -oxo- 4^4 , 3 -oxo- $4^{1,4}$) はかえってその活性を減弱すること, また digoxigenin 系化合物 (12β : OH) の活性は digitoxigenin 系化合物 (12β : H) に比し約 1/3 であることなどが判明した。

A 環修飾 Cardenolide の合成

強心作用の発現にステロイド骨格の存在が必要条件であるか否かを知る目的で、数種のA環修飾 cardenolide を合成し、その強心作用を検討した。

まず (34) を原料とし RuO_4 により酸化的に環開裂してケト酸 (50a) を得、さらにジアゾメタンで処理して methyl ester (50b) に導いた。ついで (50b) を NaBH_4 還元し 5 位水酸基の立体配置が異なる epimer (51a, 52a) を約 2 : 1 の生成比で得た。一方、(50a) を NaBH_4 還元し付すと epimeric 5-hydroxy-3-oic acids を生成し、これらは分子内でラクトン化して 3-oxo-4-oxa 体 (53, 54) を約 2 : 1 の量比で与えた。

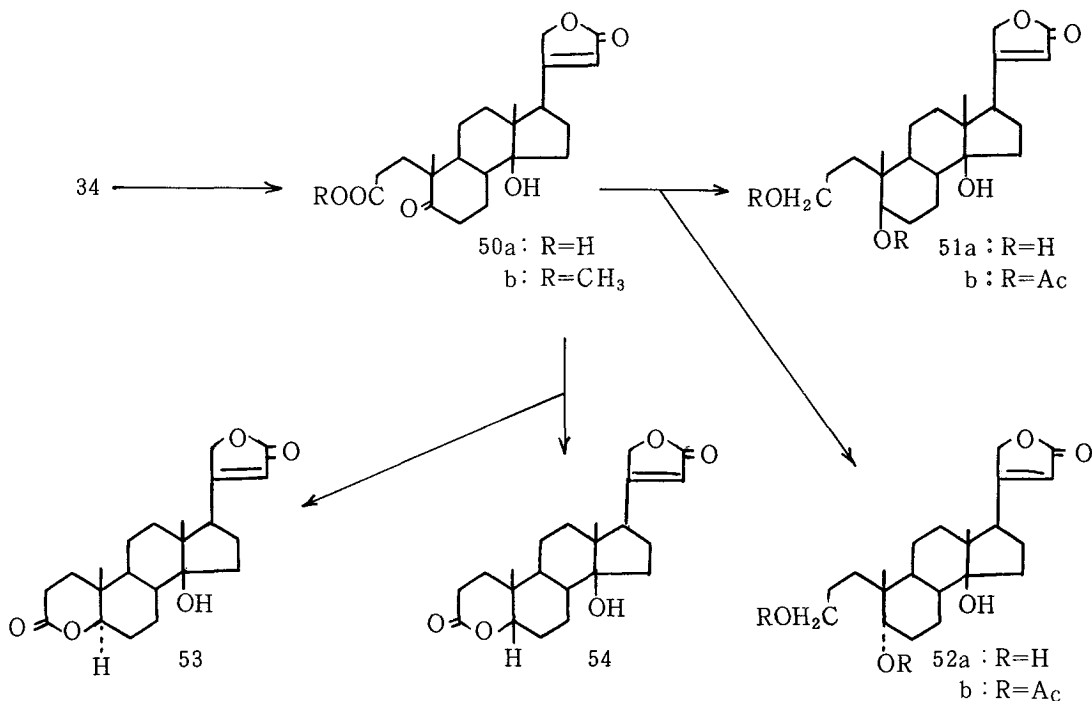


Chart 5

合成したA環修飾 cardenolide はこの種の化合物としては最初のタイプであり、それらの強心作用を Straub 法を用いて検討した。Table IVに示すごとく (50 a) 以外の化合物に活性が認められ、ステロイドA環の存在は作用発現にかならずしも必要でないことが判明した。また、(51a) は (52a) より、(54) は (53) より強い活性の発現がみられ、Table IIIに示した構造-活性相関 ($3\beta\text{-OH} > 3\alpha\text{-OH}$, $5\beta\text{-H} > 5\alpha\text{-H}$) を支持する結果を得た。

Straub 法およびモルモット摘出心におけるこれらA環修飾 cardenolide のレスポンスと digitoxigenin (29) のそれとの間に質的差異は認められず、さらに (50b) および (54) はカエル心筋に対しカリウムイオン濃度増加に比例した筋収縮力増強を惹起した。これらの事実はA環修

Table IV Cardiotonic Activities of Ring -A Modified Cardenolides

Compound	C - contr. (g/ml)	RP (29=1,0)
29	3×10^{-7}	1.0
50 a	—	(inactive)
50 b	$3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$	0.03 - 0.1
51 a	3×10^{-5}	0.01
52 a	$> 3 \times 10^{-5}$	< 0.01 *
53	$> 3 \times 10^{-5}$	< 0.01 *
54	$3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$	0.03 - 0.1

*No tendency to contracture at 3×10^{-5} g/ml

飾 cardenolide の生理作用が天然の強心ステロイドと本質的に同一であることを示しており、構造一活性相関、作用機作とも関連して興味もたれる。

論文審査結果の要旨

本研究は19-ノルステロイドA環の酵素的変換における立体化学ならびにカルデノリドA環を化学修飾した変形ステロイドの構造活性相関を検討したものである。

まず、19-ノルステロイドの酵素的芳香核化におけるC-2水素の脱離機構を明らかにするため epimeric [2-³H] estr-4-ene-3, 17-diones の合成を行なった。すなわち19-ノルテストステロンから製した estr-2-ene-5 β , 17 β -diol を中間体とし、2 β , 3 β -epoxide の LiAlEt³H₄ による還元的開裂反応、 Δ^2 の B₂³H₆ による tritio-boration を行ない、2 α および 2 β にそれぞれ³H 標識したのち順次アセチル化、脱水、水解さらに酸化により目的とする³H 標識化合物を得た。これらに [4-¹⁴C] estr-4-ene-3, 17-dione を加えて一定の³H/¹⁴C 値を示す基質を調製し、NADPHの存在下ヒト胎盤 10,000 \times g 上清とインキュベートした。反応成績体を分離し、³H/¹⁴C 値を測定した結果、芳香核化において2 β 水素が立体特異的に脱離することが判明した。*Bacillus sphaericus* による芳香核化についても同様の手法を用いて吟味し、2 β 水素の立体特異的な脱離が確認された。

ついで5 β -カルデノリドを5 α 体に変換する反応条件を種々検討し、triglyme 中パラジウム炭の共存下加熱還流する方法を確立するとともに本法により digoxigenin から誘導した5 α -digoxigenin が従来から構造不明のまま残されていた syriogenin と同一物であることを立証した。また、 Δ^4 -3-oxo 基を四酸化ルテニウムで酸化的に開裂してケト酸を得、さらに NaBH₄ 還元で付して3-oxo-4-oxa 体を製した。

これらA環修飾カルデノリドの強心作用をStraubの標本を用いて検討し、その結果A環の存在は作用発現上必ずしも必要でないこと、またカルデノリドの強心作用は一般に化学構造上3 β -OH > 3 α -OH, 5 β -H > 5 α -Hであることを明らかにした。

以上のごとく本論文は立体特異的に標識した基質を用いて19-ノルステロイドの酵素的芳香核化の機構を解明するとともに、従来未開拓であったカルデノリドA環の化学的変換法を開発し、構造活性相関に数々の新知見を加えたものであり学位論文として十分価値あるものと認める。