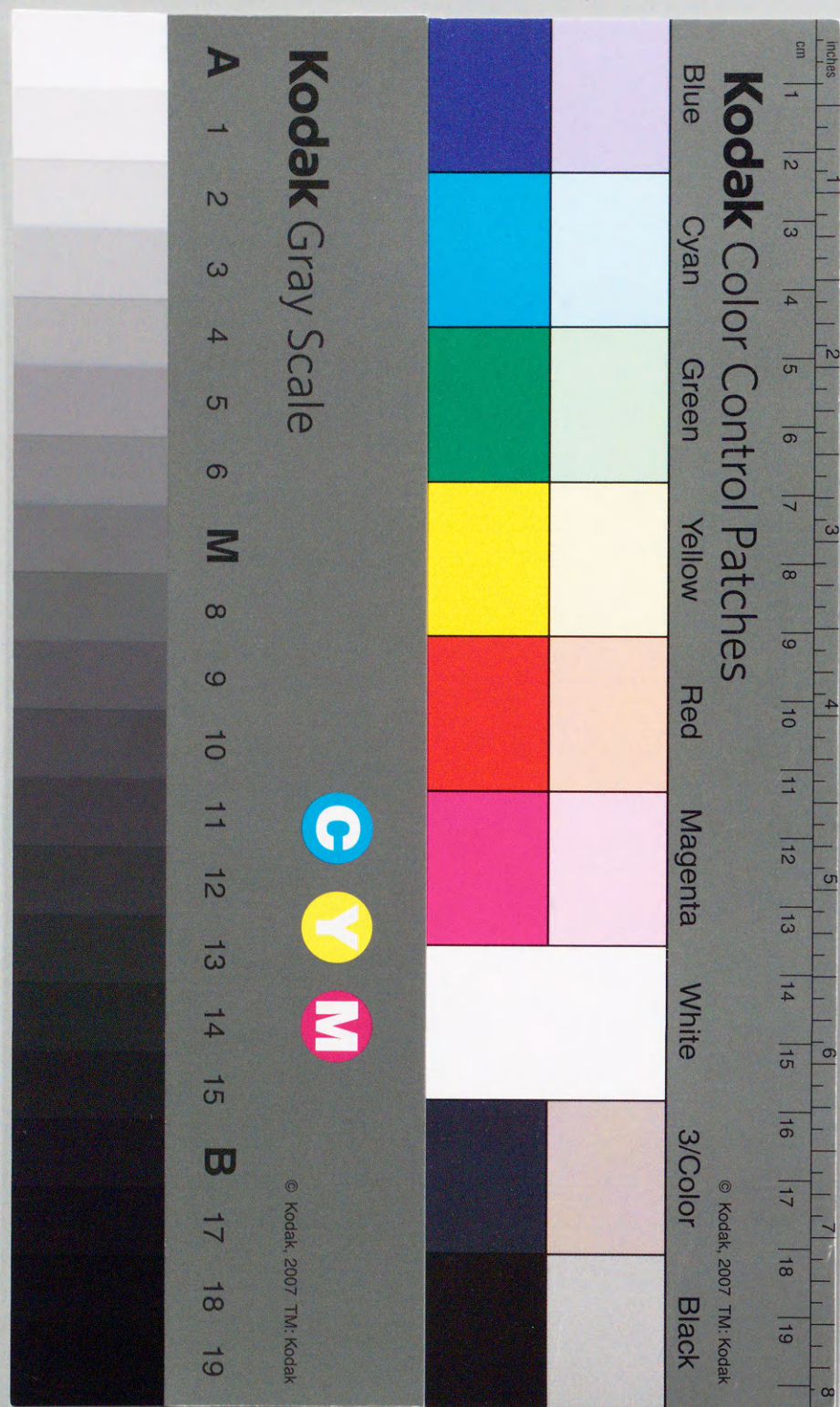


カイコの卵エクジステロイドの  
精製と構造解析

1 9 9 5

勘 場 麻 里





①

カイコの卵エクジステロイドの  
精製と構造解析

1995年

甲南大学大学院自然科学研究科

勘場麻里



## 目次

要旨	5
緒言	7
略記	11
実験材料および方法	
1. 材料	13
2. 試薬	14
3. 卵巣と卵内のエクジステロイドの分析	14
4. エクジステロイドの抽出と単離精製	16
5. イチイからの22d20Eの抽出と精製	16
6. 薄層クロマトグラフィー (TLC)	17
7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)	18
8. ラジオイムノアッセイ (RIA)	20
9. 質量分析と核磁気共鳴測定	20
10. カイコ蛹の分離腹部 (未成熟卵巣) による22d20Eの生物活性の検定	21
結果	
1. 卵巣のエクジステロイドの分析	21
2. 卵のエクジステロイドの分析	28
3. 卵巣の遊離型エクジステロイドUKE-5と卵巣および卵の遊離型 エクジステロイドUKE-7の精製	
3-1. 遊離型エクジステロイドの抽出とTLCによる精製	37
3-2. UKE-5の精製	37
3-3. UKE-7の精製	39
4. 卵巣の抱合型エクジステロイドC-UKE-5およびC-UKE-7の精製	

4-1. 卵巣の抱合型エクジステロイドC-UKE-5およびC-UKE-7 の分離	41
4-2. C-UKE-5の精製	41
4-3. C-UKE-7の精製	41
5. 卵の抱合型エクジステロイドC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3および C-UKE-6の精製	
5-1. 卵の抱合型エクジステロイドC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3 およびC-UKE-6の分離	41
5-2. C-UKE-1の精製	43
5-3. C-UKE-2の精製	43
5-4. C-UKE-3の精製	46
5-5. C-UKE-6の精製	46
6. エクジステロイドの構造解析	
6-1. 構造解析法	47
6-2. UKE-5の構造解析	47
6-3. C-UKE-5の構造解析	53
6-4. C-UKE-1の構造解析	56
6-5. C-UKE-1の加水分解産物, UKE-1の構造解析	59
6-6. C-UKE-6とその加水分解産物, UKE-6の構造解析	61
6-7. C-UKE-3とその加水分解産物, UKE-3の構造解析	66
6-8. C-UKE-2とその加水分解産物, UKE-2の構造解析	71
6-9. UKE-7の構造解析	
6-9-1. MSとNMRスペクトルによるUKE-7の構造解析	81
6-9-2. アセチル化によるUKE-7の構造解析	
1) ステロイドのアセチル化	86
2) 2dEのアセチル化	86



3) UKE-7のアセチル化	87
4) 23(R),25-dihydroxycholesterolと23(S),25-dihydroxycholesterol のアセチル化	88
6-10. C-UKE-7の構造解析	91
7. 22d20Eのオゾン酸化(3-デヒドロ体の合成)	91
8. カイコ蛹の分離腹部における22d20Eの生物活性	93
考察	97
引用文献	105
謝辞	112
公表論文リストおよび公表論文	
1. 論文および口頭発表リスト	113
2. 副論文(1)	115
3. 副論文(2)	120
4. 副論文(3)	126
5. 副論文(4)	134

## 要旨

昆虫の脱皮ホルモン(エクジステロイド)は、前胸腺や卵巣・卵系で合成されるステロイドホルモンである。前胸腺で合成されたエクジステロイドが幼虫や蛹の脱皮や変態を支配することは古くから知られている。しかし、卵巣・卵系に含まれるエクジステロイド(卵エクジステロイドと呼ばれている)については、種々の昆虫で卵巣の成熟や胚の発生の調節に関与しているという仮説が提案されているが、まだ十分に解析は進んでいない。

本研究では、カイコ *Bombyx mori* を用いて、卵エクジステロイドの代謝系や生理作用の解析の手がかりを得るために、卵エクジステロイドを精査し、今迄に報告されていないエクジステロイドの構造解析を行った。

従来、カイコの卵エクジステロイドの分析は、主に逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)にてエクジステロイドを分離した後に、UV吸収とラジオイムノアッセイ(RIA)にて検出するという方法であった。そして、これらの方法により、6種類の遊離型エクジステロイド(ecdysone, 20-hydroxyecdysone, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, 2-deoxyecdysone, 2,22-dideoxy-20-hydroxyecdysone, bombycosterol)と、それらのリン酸エステル(抱合型)6種類が明らかにされ、それらのエクジステロイドの代謝系の順序も仮説として提案されていた。

しかし、従来カイコの卵エクジステロイドのRIAによる検出に用いられていた抗体は、その抗体の特性から考えて、すべての卵エクジステロイドを検出しているとは限らないことが明らかとなった。そこで本論文では、カイコの卵エクジステロイドを、HPLCで分離後、UV吸収と認識部位の異なる2種類の抗体を用いたRIAにて解析を行った。その結果、これまで報告されていたエクジステロイドに加えて、さらに12種類のエクジステロイドを検出することが



出来た。そこで、これらの新たに検出されたエクジステロイドを、薄層クロマトグラフィー、RP-HPLCなどによって単離精製したのち、それぞれを高速原子衝突質量分析 (FAB-MS) および核磁気共鳴スペクトル (NMR) にて解析し、化学構造を明らかにした。

その結果、8種類は、これまで報告されていない新たなエクジステロイドであり、そして残りの4種類は、これまで他の昆虫などで報告されているが、カイコで初めて検出されたエクジステロイドであることが明らかとなった。前者は3-*epi*-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone, 3-*epi*-22-deoxy-16( $\beta$ ),20-dihydroxyecdysone, 2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone, 22-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-phosphate, 3-*epi*-2-deoxyecdysone 22-phosphate, 3-*epi*-22-deoxy-16( $\beta$ ),20-dihydroxyecdysone 2-phosphate, 3-*epi*-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone 2-phosphate, 2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone 3-phosphateであり、後者は22-deoxy-20-hydroxyecdysone, 3-*epi*-ecdysone, 3-*epi*-2-deoxyecdysone, 3-*epi*-ecdysone 22-phosphateである。検出されたエクジステロイドの構造的な特徴として22-デオキシ型と3 $\alpha$ -エピマーが多いこと、さらにそれらがリン酸エステルを形成していることが挙げられる。

そこで、これまで報告されている卵エクジステロイドと、今回明らかにされた卵エクジステロイドから、卵エクジステロイドの代謝系について、次の点を中心に考察を行った。(1) エクジステロイドの水酸化反応という観点から、今回検出されたエクジステロイドの代謝系における位置づけを考察した。(2) 抱合型の生成は、C-22, C-3, C-2の順序で水酸基がリン酸化され易いこと、またエクジステロイドが3-デヒドロ体を経由して、3 $\alpha$ -エピマーとなる反応系では、エクジステロイドの酸化反応が律速段階となっていることなどについて考察した。(3) 卵エクジステロイドの生理的意義について考察を行った。

## 緒言

1971年にOhnishiらによって、カイコ *Bombyx mori* の卵にエクジステロイドが初めて検出され、これらのエクジステロイドが胚発生において重要な役割を果たすのではないかと示唆された。そして閉鎖系であるカイコ卵においてそのエクジステロイドは母蛾に由来し、また卵黄形成時の卵巣内で合成されることが明らかにされた (Ohnishi and Chatani, 1977)。これらに続いて、現在までにさまざまな昆虫の卵巣や卵から多くの種類のエクジステロイドが検出され、その化学構造が明らかにされてきた (Rees, 1989; Lafont and Wilson, 1992)。これら卵巣・卵系に含まれるエクジステロイドは、前胸腺から分泌されるエクジステロイドと区別し、卵エクジステロイドと呼ばれている。また、卵エクジステロイドの生理作用については、トノサマバッタ *Locusta migratoria* やタバコスズメガ *Manduca sexta* などにおいて、卵エクジステロイドが胚の伸長や胚脱皮など胚の発生と密接に関連すると報告されている (Lagueux et al., 1979; Warren et al., 1986)。これらの報告は、卵エクジステロイドが胚発生の調節因子的な役割を果たしていることを示唆している。しかし、卵エクジステロイドの生合成系や分解系、さらにそれらの調節系などは未だ十分に解明されておらず、これらの解明のためにも、卵エクジステロイドの組成を詳細に解析することが、重要であると考えられている。

現在までに昆虫で明らかにされている卵エクジステロイドの種類を分類すると、遊離型エクジステロイド、抱合型エクジステロイドおよびエクジステロイド酸 (ecdysteroid acid) の3種に大別される (Thompson et al., 1990)。遊離型エクジステロイドとは、ecdysone (E [2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,22R,25-pentahydroxy-5 $\beta$ -cholest-7-en-6-one], 図1) や20-hydroxyecdysone (20E) を代表とするような、主に5 $\beta$ -ketodiol (2,22,25-trideoxyecdysone [3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholest-7-en-6-



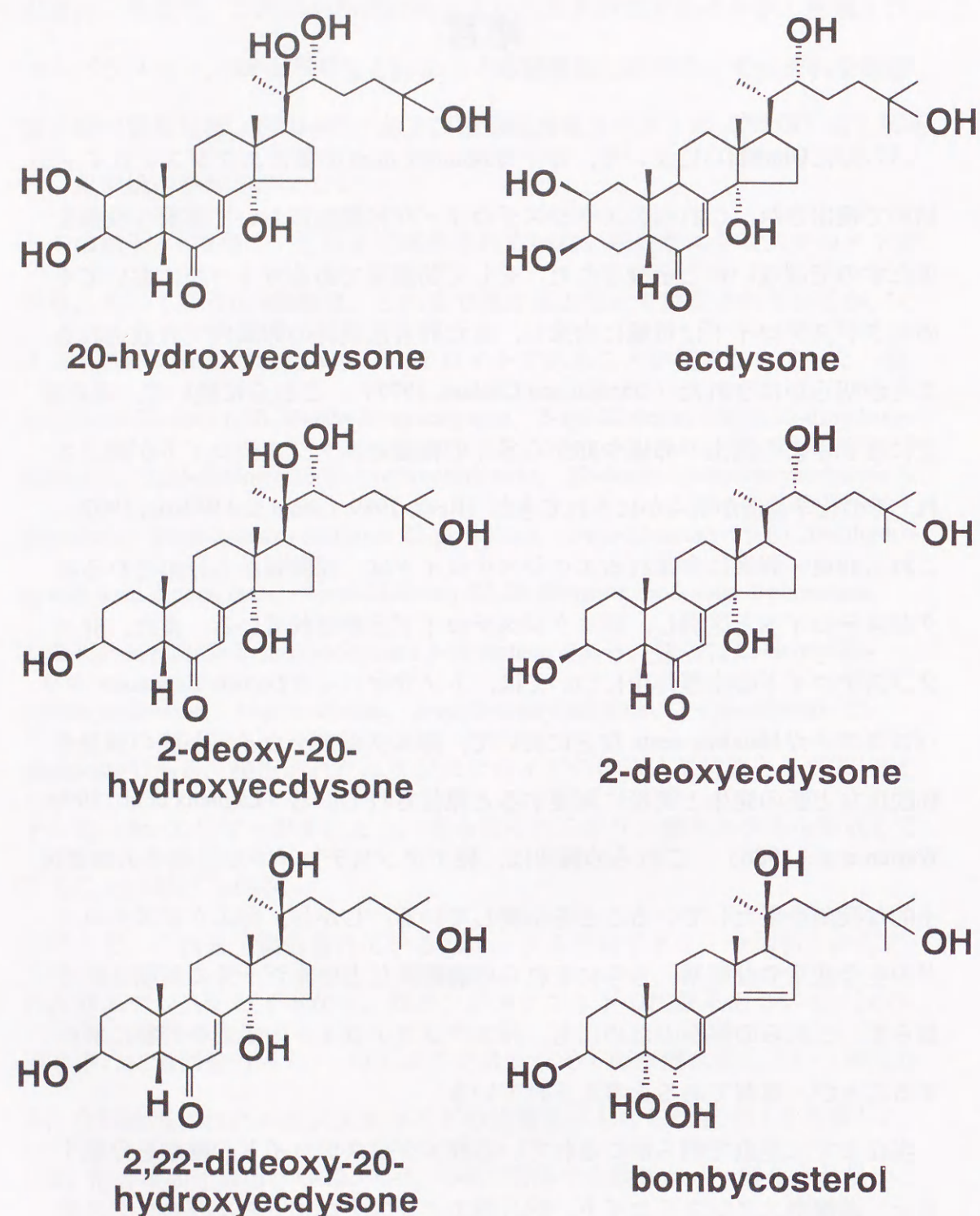


図1 カイコの成熟卵巢や卵内において明らかにされている遊離型エクジステロイドの構造

one) から水酸化反応を介して合成されるエクジステロイドと、これらの化合物の3位の異性体(上述のエクジステロイドの3 $\beta$ 位の水酸基が酸化反応により、デヒドロ体と変換された後に、さらに3位が還元されることにより、合成される3 $\alpha$ -ヒドロキシエクジステロイド)である。抱合型エクジステロイドとは、3 $\alpha$ -ヒドロキシエクジステロイドを含めた遊離型エクジステロイドをその骨格とし、さらにリン酸基、アセチル基、グルコシル基、硫酸基などがエステル結合している化合物である。エクジステロイド酸とは、26位が水酸化された後に、26位が酸化されて形成されるエクジステロイドである。

カイコの卵巢と卵については、現在までに大西グループによって6種の遊離型エクジステロイド(20-hydroxyecdysone [20E], ecdysone [E], 2-deoxy-20-hydroxyecdysone [2d20E], 2-deoxyecdysone [2dE], 2,22-dideoxy-20-hydroxyecdysone [2,22d20E], bombycosterol [B], 図1)と、それらのリン酸エステル(20E 22-phosphate [20E22P], E 22-phosphate [E22P], 2d20E 22-phosphate [2d20E22P], 2dE 22-phosphate [2dE22P], 2,22d20E 3-phosphate [2,22d20E3P], B 3-phosphate [B3P], 図2)の存在が報告されている(Ohnishi, 1986; Ohnishi et al., 1989)。これらの分析には、主に、高速液体クロマトグラフィーにて各々のエクジステロイドに分離した後に、UV吸収と1種類の抗体を用いたラジオイムノアッセイによる検出が用いられていた。

しかし、WarrenとGilbert(1986)はタバコスズメガ*M. sexta*の卵内で、認識部位の異なる抗体を用いることにより、より広範囲の種類のエクジステロイドを検出することが可能となることを証明した。このことから、カイコ卵と卵巢内には、これまで検出に使用された抗体では認識されにくい種類のエクジステロイドが含有されている可能性が考えられた。そこで本論文では、カイコの卵巢と卵内のエクジステロイドの存在を主にUV吸収と2種類の認識部位の異なる抗体を用いて解析し、新たに検出されたエクジステロイドについて、単離精製し化学構造を明らかにした。



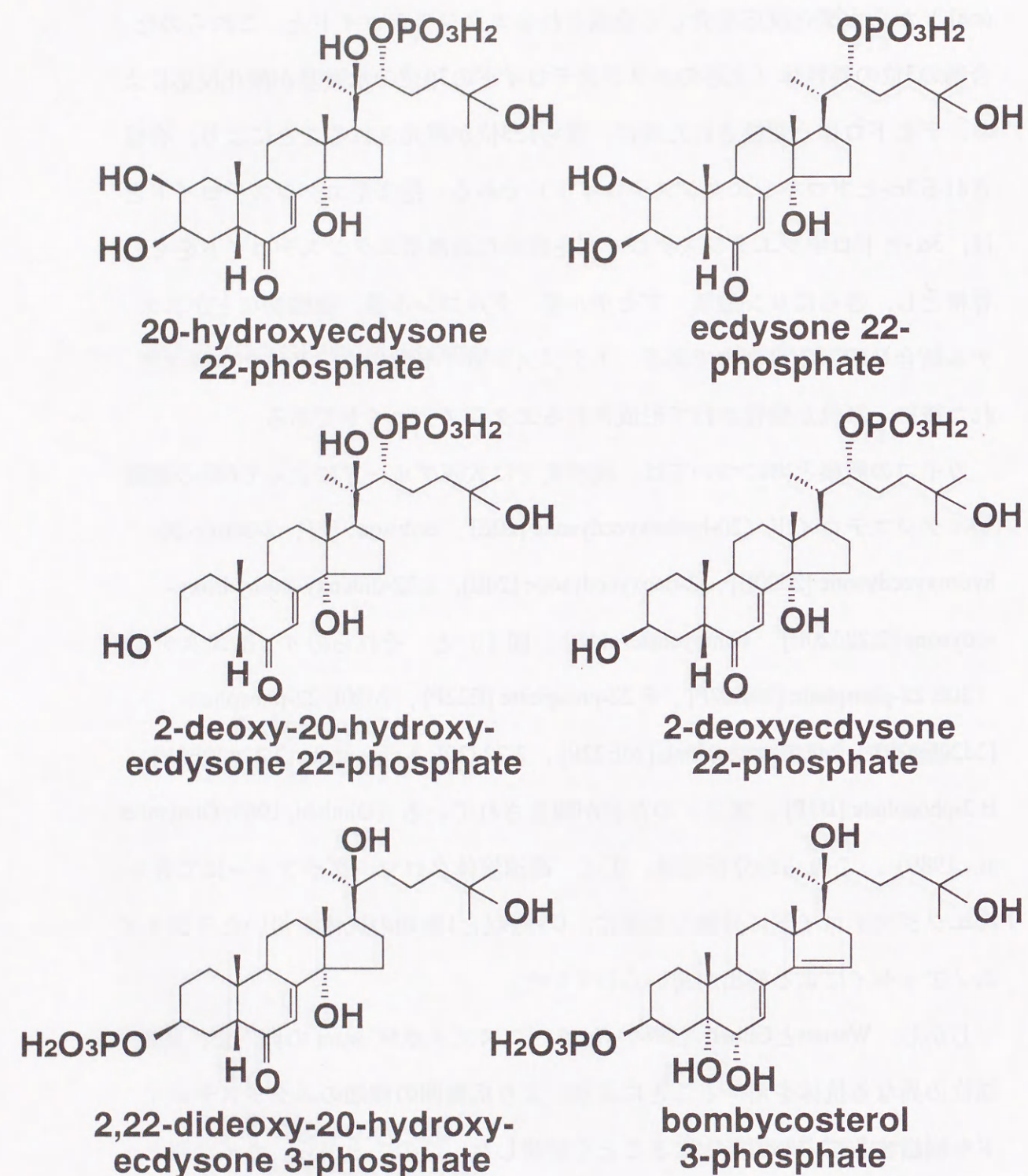


図2 カイコの成熟卵巣や卵内において明らかにされている抱合型エクジステロイドの構造

## 略記

本論文には、以下のような略記を用いた。

エクジステロイドの略記法は、Lafont らの方法 (1993) に基づき行った。また、ステロールの略記においても、この方法に準じた。

20E ;	20-hydroxyecdysone
E ;	ecdysone
E' ;	3-epi-ecdysone
26E ;	26-hydroxyecdysone
26E' ;	3-epi-26-hydroxyecdysone
2d20E ;	2-deoxy-20-hydroxyecdysone
2dE ;	2-deoxyecdysone
2dE' ;	3-epi-2-deoxyecdysone
22d20E ;	22-deoxy-20-hydroxyecdysone
22d20E' ;	3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone
22d16(β),20E' ;	3-epi-22-deoxy-16(β),20-dihydroxyecdysone
22d20,26E ;	22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone
22d20,26E' ;	3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone
16(β),20E ;	Malacosterone, 16(β),20-dihydroxyecdysone
20,23(ξ)E ;	Gerardiasterone, 20,23(ξ)-dihydroxyecdysone
20,26E' ;	3-epi-20,26-dihydroxyecdysone
2,22dE ;	2,22-dideoxyecdysone
2,22d20E ;	2,22-dideoxy-20-hydroxyecdysone
2,22d23(S)E ;	2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone
B ;	bombycosterol



2,22,25dE ;	5 $\beta$ -ketodiol, 2,22,25-trideoxyecdysone
3DE ;	3-dehydroecdysone
3D26E ;	3-dehydro-26-hydroxyecdysone
3D2dE ;	3-dehydro-2-deoxyecdysone
3D22d20E ;	3-dehydro-22-deoxy-20-hydroxyecdysone
20E22P ;	20-hydroxyecdysone 22-phosphate
E22P ;	ecdysone 22-phosphate
E'22P ;	3-epi-ecdysone 22-phosphate
2d20E22P ;	2-deoxy-20-hydroxyecdysone 22-phosphate
2dE22P ;	2-deoxyecdysone 22-phosphate
2dE'22P ;	3-epi-2-deoxyecdysone 22-phosphate
2dE'3P ;	3-epi-2-deoxyecdysone 3-phosphate
22d20E3P ;	22-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-phosphate
22d20E'2P ;	3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone 2-phosphate
22d16( $\beta$ ),20E'2P ;	3-epi-22-deoxy-16( $\beta$ ),20-dihydroxyecdysone 2-phosphate
22d20,26E'2P ;	3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone 2-phosphate
2,22d20E3P ;	2,22-dideoxy-20-hydroxyecdysone 3-phosphate
2,22d23(S)E3P ;	2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone 3-phosphate
B3P ;	bombycosterol 3-phosphate
2dE3,22Ac ;	2-deoxyecdysone 3,22-diacetate
23(R),25C ;	23(R),25-dihydroxycholesterol
23(S),25C ;	23(S),25-dihydroxycholesterol
23(R),25C3,23Ac ;	23(R),25-dihydroxycholesterol 3,23-diacetate
23(S),25C3,23Ac ;	23(S),25-dihydroxycholesterol 3,23-diacetate
分析法	
RIA ;	radioimmunoassay

HPLC ;	high-performance liquid chromatography
RP-HPLC ;	reverse-phase HPLC
NP-HPLC ;	normal-phase HPLC
TLC ;	thin-layer chromatography
[ <sup>1</sup> H] NMR ;	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
FAB-MS ;	fast-atom bombardment mass spectrometry
EI-MS ;	electron impact mass spectrometry
試薬	
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
BuOH	Butanol
EtOAc	Ethyl acetate
PTU	n-Phenylthiourea
TMS	Tetramethylsilane
NBA	m-Nitrobenzyl Alcohol

## 実験材料および方法

### 1. 材料

エクジステロイドの分析と精製のために、カイコ *B. mori* の羽化直前の成熟卵巣と産卵後10日目の休眠卵（錦秋×鐘和，東・海×朝・日，東・海×芙・容，鐘月×春嶺，朝霧）を抽出材料として用いた。卵巣は蛹から摘出後，卵はサンプリングの後，抽出実験までの間 -80 °C に保存した。

エクジステロイドの生物検定のために，蛹化直後（10分以内）の雌のカイコの胸部と腹部の間を綿糸にて結紮し，12日間25 °C に保存した後，分離腹部



として用いた。

市販品の日本産イチイ科イチイ *Taxus cuspidata* から22d20Eを得るために、乾燥葉と小枝のうち、葉を選別し、抽出材料として用いた。

## 2. 試薬

[23,24-<sup>3</sup>H] E ([<sup>3</sup>H] E, 89 Ci/mmol)はDuPont/NEN Research Productsより購入した。E, 20E, 2d20E, 2dEはSigma社のものを使用した。

カイコの卵巣より精製したB, 2,22d20E, エクジステロイドのリン酸エステルは、大西英爾教授（岡山理科大学）より譲与していただいた。カイコの卵より精製した22d20E'およびカイコの卵より部分精製した未同定エクジステロイドフラクションは、間宮祥隆氏（甲南大学、日本シエーリング株式会社）より譲与していただいた。

23(R),25C, 23(S),25Cの合成は、Ikekawaら（1981）とHiranoら（1983）の方法に従い行った。また、エクジステロイドの3-デヒドロ体の合成とステロイドのアセチル化は、それぞれDinanとRees（1978）とGalbraithとHorn（1969）の方法に従い行った。イチイから22d20Eの抽出と精製は、Nakanoら（1982）の方法をもとに行った。いずれの合成化合物および天然品についても、[<sup>1</sup>H] 核磁気共鳴スペクトルにてその構造の解析を行い、目的物であることを確認した。詳細は、結果の章で述べる。

## 3. 卵巣と卵内のエクジステロイドの分析

-80℃で保存していた卵巣あるいは卵（10 g）を70% MeOH（23.5 ml）中ですり潰し、遠心分離（11,000 × g, 15分）し上清を集め、沈殿を同様の方法にて2度再抽出した。回収した上清を、脂質を除去するため等量の70% MeOHで飽和させたhexaneと懸濁し、分配した。70% MeOH層を減圧下で濃縮し、蒸発乾固させた後に、100% EtOHを加えて4℃で24時間保存し、グリコーゲンなどの夾雑物を沈殿させた。溶液を減圧下で濃縮し、シリカゲルカラム（Bond

Elut silica カートリッジ; 500 mg; Varian）にて遊離型エクジステロイド（10 mlのMeOH-CHCl<sub>3</sub> [3:7, v/v] 混液にて溶出）と抱合型エクジステロイド（10 mlのMeOHにて溶出）に分離した。

遊離型エクジステロイド分画は、減圧濃縮後、RP-HPLC（システム1, 後述）/RIAにて分析した。

一方、抱合型エクジステロイド分画は、濃縮後、セミ分取用の逆相系高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC, システム3, 後述）にて分離した。抱合型エクジステロイドは次の2つの方法によって検出した。1つは標準の抱合型エクジステロイドの溶出時間との比較によって、もう1つは、抱合型をカタツムリ由来の消化酵素（*Helix pomatia* juice, IBF）あるいは、子牛の小腸由来のalkaline phosphatase（Grade II, Boehringer Mannheim）で遊離型エクジステロイドに加水分解し、遊離型エクジステロイドをRP-HPLC（システム1または2, 後述）とラジオイムノアッセイ（RIA）にて検出する方法である。

*H. pomatia* juiceは、数種類の酵素液（β-glucuronidase, arylsulfatase, acid phosphataseなど）の混合物であるため、抱合型エクジステロイドのリン酸、硫酸および脂肪酸などのエステル結合の加水分解に適している。抱合型を*H. pomatia* juiceにて加水分解する場合は、抱合型エクジステロイド分画を50 mMの酢酸緩衝液（pH 5.1, 500 μl）内で5 μlの*H. pomatia* juiceと6時間、35℃にて反応させ、4倍（v）のMeOHを加え、その反応を停止した。この溶液を遠心分離（3,000 × g, 20分）し、上清を蒸発乾固させた後に、5 mlのH<sub>2</sub>Oを加えて、C<sub>18</sub>のカラム（Bond Elut C<sub>18</sub> カートリッジ; 200 mg; Varian）にて脱塩を行った（Rees and Isaac, 1985）。このカラムは10 mlのH<sub>2</sub>Oにて塩を溶出させ、さらに10 mlの60% MeOHにて遊離型エクジステロイドを溶出させた。

また、抱合型を子牛の小腸由来のalkaline phosphataseにて加水分解する場合は、抱合型エクジステロイド分画を0.2 Mのグリシン緩衝液（pH 10.5, 500 μl）内で5 μlのalkaline phosphataseと6時間、35℃にて反応させた。この反応生成物



は*H. pomatia* juiceによる加水分解と同様の手順にて脱塩を行い、遊離型エクジステロイド分画を得た。

#### 4. エクジステロイドの抽出と単離精製

エクジステロイドを精査するために、約6 kg（湿重量）の卵巣あるいは約9 kg（湿重量）の卵を抽出した。これらの抽出と精製方法の原理は、上述のエクジステロイドの分析に示した方法と同じである。6 kgの卵巣をすり潰し、7.2 lのEtOHにて抽出、残渣を2 lの80% EtOHにて2回再抽出した。抽出溶液を濾紙にて濾過し、卵殻等を除去後、エクジステロイドの分析の場合と同様に遠心分離、脂質の除去のために等量のhexaneにて分配、EtOHによるグリコーゲンなどの夾雑物の除去などの過程を経て、エクジステロイド分画を得た。

エクジステロイドの分画は、卵巣100 g相当量ごとにシリカゲルカラム（分取用 BOND SIL; 10 g; Varian）に供した。カラムは最初100 mlのCHCl<sub>3</sub>で洗浄し、次に50 mlのMeOH-CHCl<sub>3</sub>（3:7, v/v）混液で遊離型エクジステロイドを溶出させ、さらに100 mlの100% MeOHで抱合型エクジステロイドを溶出させた。また、約9 kg（湿重量）の卵からエクジステロイドの精査を行う目的で、Mamiyaら（1995）により、卵巣と同様の手順で抽出・精製がなされた。さらなる、卵巣および卵の各エクジステロイドの精製過程の詳細は、結果の章で述べる。

#### 5. イチイからの22d20Eの抽出と精製

22d20Eの抽出と精製には、1.5 kg（乾燥重量）のイチイの葉を使用した。これらの抽出と精製方法の原理は、Nakanoら（1982）の示した方法と同じである。1.5 kgの葉を10 lのEtOHを用いて加温抽出（80℃）し、さらに各々5.6 lのEtOHにて同様に5回再抽出した。抽出溶液を濾紙にて濾過後、減圧下で濃縮し、乾燥した。次に、乾燥抽出物を、3 lの50% n-BuOHにて分配し、そのBuOH層を減圧下で蒸発乾固した。乾燥物は1 lのhexaneと500 mlの70% EtOHにて分配

後、hexane層を除去し、さらに各々1 lのhexaneを加えて、同様に9回再分配を行った。最終的に得られた70% EtOH層を減圧下で乾固させ、その乾燥物はイチイ葉約300 g相当量ごとにシリカゲルカラム（Silica gel 60 [Merck社, 70-230 mesh, Art.7734], 500 g, 5 × 45 cm）に付し、500 mlのCHCl<sub>3</sub>で洗浄し、2.25 lのCHCl<sub>3</sub>-MeOH（10:1, v/v）混液にてフラボンとponasterone Aを含む分画を溶出させ、1 lのCHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O（40:10:1, v/v/v）混液にて22d20Eを溶出させた。22d20Eを含む分画は、蒸発乾固後にシリカゲルカラム（Silica gel 60, 500 g, 5 × 45 cm）に付し、450 mlのCHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O（90:10:1, v/v/v）混液にて洗浄し、850 mlのCHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O（170:30:3, v/v/v）混液にて不純物を溶出させ、さらに500 mlの同一の混液（CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O [170:30:3, v/v/v]）にて22d20Eを溶出させた。22d20Eを含む分画は、さらに同条件のシリカゲルカラムにて再精製した。得られた22d20Eを含む分画は、蒸発乾固後、イチイ葉約190 g相当量ごとにシリカゲルカラム（Silica gel 60, 45 g, 2 × 25 cm）に付し、240 mlのEtOAc-CHCl<sub>3</sub>-MeOH（6:1:6, v/v/v）混液にて洗浄し、100 mlのEtOAc-CHCl<sub>3</sub>-MeOH（3:1:6, v/v/v）混液にて不純物を溶出させ、さらに640 mlの同一の混液（EtOAc-CHCl<sub>3</sub>-MeOH [3:1:6, v/v/v]）にて22d20Eを溶出させた。22d20Eを含む分画は、蒸発乾固後、イチイ葉約30 g相当量ごとにセミ分取用のRP- HPLC（システム4）にて精製し、得られた22d20E分画は蒸発乾固の後、MeOHで再結晶した。

#### 6. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLCによる分取、精製および分析には、Silica gel 60 F254（Merck社、分取用プレート[20 × 20 cm, 厚さ1.0 mm, Art.13895], 精製用プレート[20 × 20 cm, 厚さ0.5 mm, Art.5744], 分析用プレート[アルミシート, 20 × 20 cm, 厚さ0.2 mm, Art. 5554]）を使用した。

分取用プレートは、カイコの卵巣（約6 kg）あるいは卵（約9 kg）より得た



遊離型エクジステロイド分画中の黄色を呈する大量の不純物とエクジステロイドを大別するために使用した。1枚の分取用プレートに対し、約300 gの卵巣あるいは卵に相当するサンプルをCHCl<sub>3</sub>-96% EtOH (4:1, v/v) 混液 (溶媒1) にて展開し、乾燥後、さらに (溶媒1) にて展開した (二重展開法)。

イチイの葉より得た各抽出分画内の22d20Eの有無は、分析用プレート (4 × 8 cm) にて確認した。カラムクロマトグラフィー (前述) にて得た分画 (10-500 ml) のうち3 μl をプレートに添付し、乾燥後、CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (40:10:1, v/v/v) 混液 (溶媒2)、あるいはCHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O (4:4:10:1, v/v/v/v) 混液 (溶媒3) にて展開した。展開後、プレート全面に10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を均一に散布し、電熱器による加熱処理にてステロイドを呈色させた。

アセチル化後の各ステロイドは精製用のプレート (5 × 10 cm) を用い、CHCl<sub>3</sub>-MeOH (10:1, v/v) 混液 (溶媒4) にて展開した。

3-デヒドロ体として合成された各エクジステロイドは精製用のプレート (5 × 10 cm) を用い、CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:1, v/v) 混液 (溶媒5) にて展開した。

分取、精製用のTLCプレートにて展開後の各エクジステロイドは、プレートに直接UVライト (254 nm) を照射し、各々蛍光の消光により検出した。エクジステロイドを含む領域のシリカゲルを回収し、CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1, v/v) 混液にてゲルから抽出した。

## 7. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLCは、高速液クロシステム (島津HPLCシステムLC-9A またはPharmacia Biotech HPLCシステム2150) を使用した。カラムはカラムオープン (島津CTO-6A) にて40 °Cに保って使用した。

HPLCによるエクジステロイドの分離は、以下に示す移動相を使用した。

(1) システム1: 流速1 ml/minで分析用逆相カラム (Wakosil 5C<sub>18</sub>, 4.6 × 250 mm; Wako) を使用した。移動相は、30分まで45% MeOH, 30分以降は55%

MeOHを用いた。(2) システム2: 流速1 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相として55% MeOHを用いた。(3) システム3: 流速2 ml/minでセミ分取用逆相カラム (Wakosil 5C<sub>18</sub>, 10 × 250 mm; Wako) を使用した。移動相は、10% MeOHを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.56) を70分間にMeOH濃度を10%から70%へ直線的に濃度勾配をつけた (Ohnishi et al., 1989)。(4) システム4: 流速1 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相として45% MeOHを用いた。(5) システム5: 流速1 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相として40% MeOHを用いた。(6) システム6: 流速1 ml/minで分析用順相カラム (NUCLEO SIL 100-5, 4.6 × 150 mm; Chemco) を使用した。移動相としてMeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:93, v/v) 混液を用いた。(7) システム7: 流速0.5 ml/minでシステム6と同様の順相カラムを使用した。移動相としてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-isopropanol-H<sub>2</sub>O (125:25:2, v/v/v) 混液を用いた。(8) システム8: 流速1 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相は、30分まで50% MeOH, 30分以降は60% MeOHを用いた。(9) システム9: 流速1.0 ml/minでシステム2と同様のセミ分取用逆相カラムを使用した。移動相として48% MeOHを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.56) を用いた。(10) システム10: 流速1.5 ml/minでシステム2と同様のセミ分取用逆相カラムを使用した。移動相として60% MeOHを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.56) を用いた。(11) システム11: 流速1.0 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相として37% MeOHを用いた。(12) システム12: 流速1.5 ml/minでシステム2と同様のセミ分取用逆相カラムを使用した。移動相として40% MeOHを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.56) を用いた。(13) システム13: 流速1.0 ml/minでシステム1と同様の逆相カラムを使用した。移動相として25% MeOHを用いた。(14) システム14: 流速0.7 ml/minで分析用逆相カラム (TSK-GEL C<sub>18</sub>, 4.2 × 150 mm; Tosoh) を使用した。移動相として89% MeOHを用いた。



溶媒としてリン酸緩衝液を用いた場合、HPLCより集められたサンプルは、Bond Elut C18にて脱塩（実験材料および方法の章、3項参照）を行った。

## 8. ラジオイムノアッセイ（RIA）

HPLCで分離後、分取した各々の分画のRIA活性は認識部位の異なる2種類の抗体、S-3抗血清とH-22抗血清を用いて既報（Sonobe et al., 1991）に従いエクジステロイドを定量した。S-3抗血清は桜井勝教授（金沢大学）より、H-22抗血清はProfessor L. I. Gilbert（North Carolina 大学）より桜井勝教授を介して譲与していただいた。エクジステロイドの検出値はエクジソン相当量で表した。

S-3抗血清は主に、エクジステロイドの側鎖の水酸基等の修飾の違いを認識することが出来るが、ステロイド骨格のA環に関する官能基の変化を認識しえない。一方、H-22抗血清は主に、エクジステロイドの骨格のA環に関する水酸基等の修飾による違いを認識することが出来るが、ステロイドの側鎖側の同様の修飾による違いを認識しえない（Sonobe et al., 1991; Kamba et al., 1994, in preparation; 勘場ら, 1995）。以上のような2種類の抗血清のエクジステロイドに対する特異性を利用し、未同定エクジステロイドの検出およびそれぞれの構造上の特徴の推定に使用した。

## 9. 質量分析と核磁気共鳴測定

[<sup>1</sup>H] 核磁気共鳴（NMR）スペクトルの測定は、JEOL GSX-500分光計あるいはJEOL GSX-270分光計（26-27℃）にて行った。溶媒は、CD<sub>3</sub>OD、CDCl<sub>3</sub>あるいはD<sub>2</sub>Oを使用した。CD<sub>3</sub>ODとCDCl<sub>3</sub>を使用する場合には、基準物質としてTMSを加えて測定した。D<sub>2</sub>Oでは、DHO由来のシグナルを4.77 ppmとして測定した。ポジティブとネガティブ高速原子衝撃質量分析（FAB-MS）スペクトルは、JEOL JMS-DX 300分光計にて測定し、マトリックスにはglycerolまたはNBAを使用した。電子衝撃質量分析（EI-MS）スペクトルは、JEOL JMS-AX 505 HA質量分光計を用いてイオン化電圧70eVにて測定した。

## 10. カイコ蛹の分離腹部（未成熟卵巣）による22d20Eの生物活性の検定

正常発育を遂げるカイコあるいは蛹化直後に結紮したカイコの卵巣重量を調べるために、蛹化後0日目から12日目に各々3個体から卵巣を摘出し、重量を測定した。

次に、結紮後12日目のカイコの分離腹部（未成熟卵巣）に、以下に示す様々な濃度のエクジステロイド（22d20Eまたは20E）あるいは、これらの対照として10% EtOHを注射し、その活性を調べた。注射液は1個体あたり、20 μlの10% EtOH（PTU飽和）、20 μlの10.0 μgから1.25 μgの20E希釈液、あるいは20 μlの60.0 μgから3.75 μgの22d20E（イチイから精製）希釈液を注射した。シリンジにて注射した後、その注射部位をパラフィンにて覆い、蛹から注入溶液と体液の流失を防いだ。蛹は25℃にて保存した。注射後12日目に各々5個体から卵巣を摘出し、重量を測定した。

## 結果

### 1. 卵巣のエクジステロイドの分析

羽化直前のカイコの成熟卵巣に存在するエクジステロイドを、材料と方法に示した手順に従い抽出し、2g（湿重量）に相当する遊離型エクジステロイド分画を分析用のRP-HPLC（システム1）／RIAにて分析した（図3）。HPLC上でフラクションナンバー19, 34, 46, 79および91のピークは遊離型エクジステロイドの標準物質（20E, E, 2d20E, 2dE, 2,22d20E）の溶出時間と一致した。そしてBの標準物質と一致する254 nmのUV吸収がフラクションナンバー123から得られた（UV吸収データは省略）。以上の結果から、カイコ卵巣内において既知の6種類のエクジステロイドを確認した。さらに4種類が、フラ



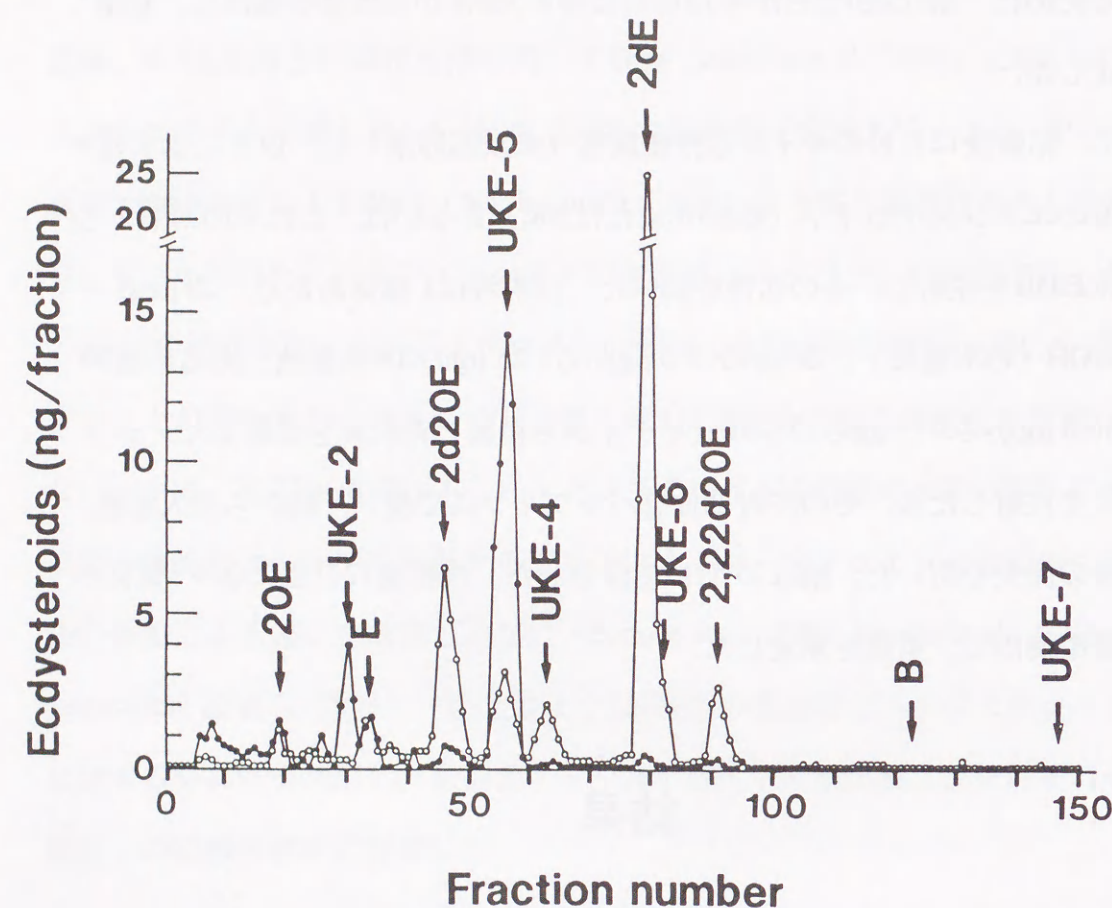


図3 成熟卵巣から抽出した遊離型エクジステロイドのHPLCパターン

RP-HPLC (システム1) にて分離した。エクジステロイドはRIAにて定量し、エクジソン相当量で表した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。S-3抗体は(○)；H-22抗体は(●)で示した。

クションナンバー28-32, 53-59, 60-66, 81-84にRIAにて検出され(図3), そして1種類が, フラクションナンバー145-149にて254 nmのUV吸収として検出された(UV吸収データは省略)。このフラクションナンバー146-148のピークは, 2g(湿重量)に相当する遊離型エクジステロイド分画をRP-HPLC(システム2)にて分析したところ, 既知のエクジステロイドである2,22d20EおよびBと同様に, UV吸収を示すピーク(図4)として得られた。これまでカイコの卵巣では, これらの溶出時間に遊離型エクジステロイドは検出されていない。そこでこれら5種類のピーク(図3)は新規あるいは未同定のエクジステロイドであると考えられた。

さらに, これら5種類の抗体に対する反応性から, フラクションナンバー28-32(15.0分)とフラクションナンバー53-59(28.0分)に溶出する化合物は, いずれもH-22抗体に強く反応する(図3)ことから, Eや20Eと比較し, 主に側鎖側に修飾を受けたエクジステロイドであることが明らかとなった。一方, フラクションナンバー60-66(31.5分)とフラクションナンバー81-84(40.5分, 2dEのピークのショルダーとして検出)に溶出する化合物はS-3抗体に強く反応する(図3)ことから, Eや20Eと比較し, 主にA環側に修飾を受けたエクジステロイドであることが明らかとなった。そして, フラクションナンバー145-149(73.5分, 図3)に溶出する化合物は, UV吸収を有するが(図4), S-3抗体とH-22抗体のいずれにおいても検出されない(図3および4)ことから, 既知のエクジステロイドであるBと同様に, A環と側鎖側の両側に修飾を受けたエクジステロイドである可能性が考えられた。

次に, これら新たに検出されたエクジステロイドが, 抱合型としても卵巣中に存在しているかどうか調べるために, 実験材料および方法の項で述べた手順によって得た抱合型エクジステロイド分画(1g[湿重量]に相当)をH. pomatia juiceにて加水分解し, RP-HPLC(システム1)/RIA(図5)にて分析した。その結果, 加水分解産物として得られた分画中に, 上述の5種類の遊離



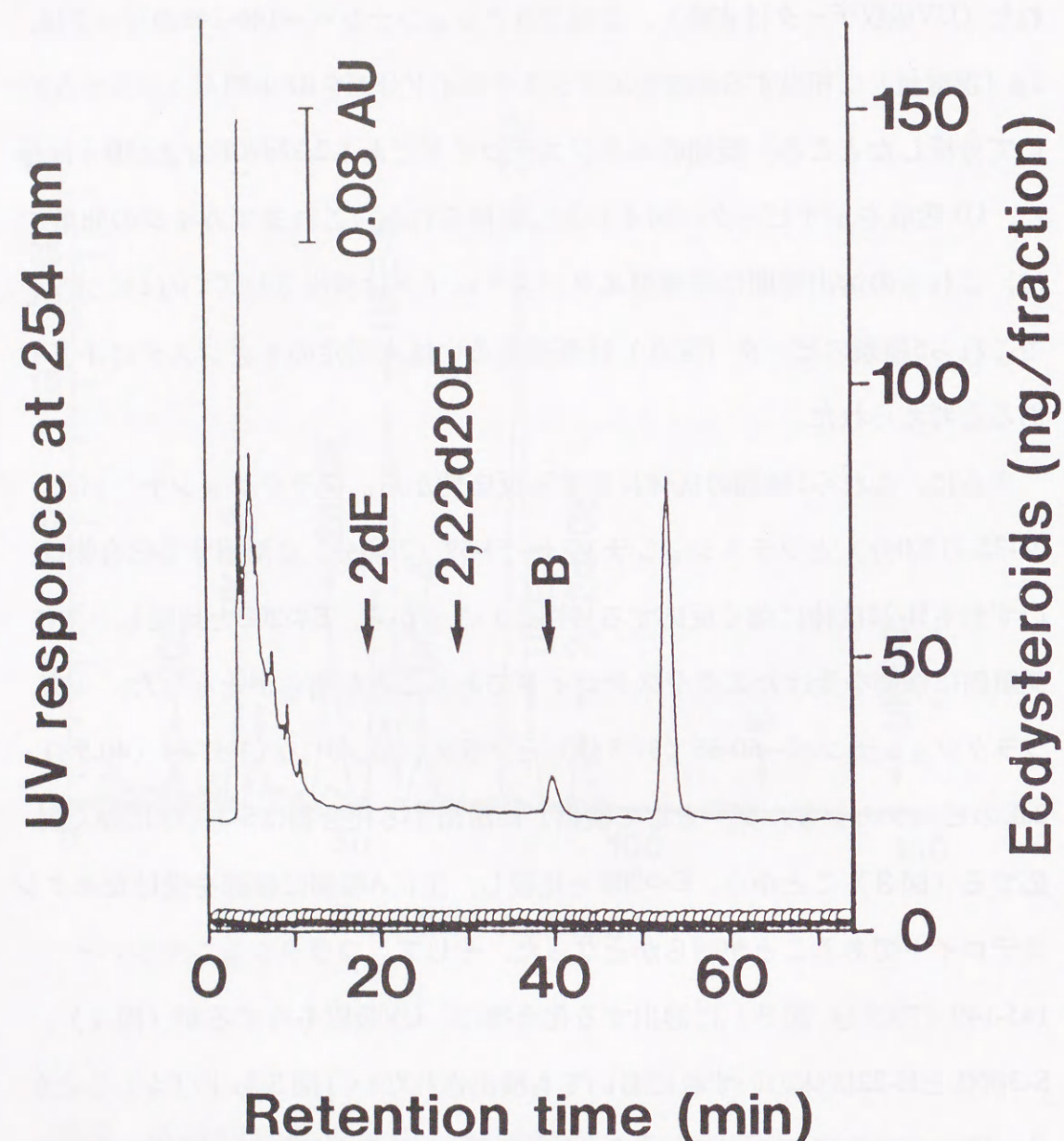


図4 成熟卵巣から抽出した遊離型エクジステロイドのHPLCパターン  
RP-HPLC (システム2) にて分離した。エクジステロイドは254 nmで検出後、RIAにて定量し、エクジソン相当量で表した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。S-3抗体は(○)；H-22抗体は(●)で示した。

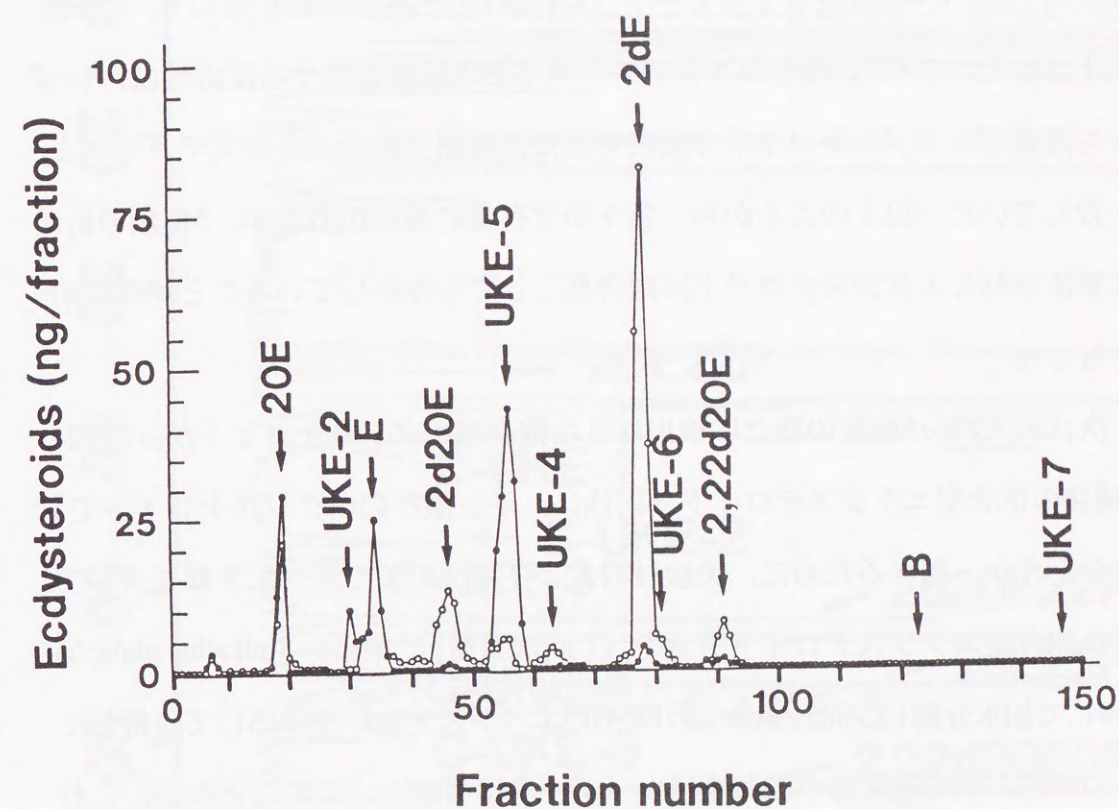


図5 成熟卵巣から抽出した抱合型エクジステロイドを加水分解した後に得られた遊離型エクジステロイドのHPLCパターン  
*Helix pomatia* juiceにて加水分解し、得られた遊離型エクジステロイドをRP-HPLC (システム1) にて分析した。エクジステロイドはRIAにて定量し、エクジソン相当量で表した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。S-3抗体は(○)；H-22抗体は(●)で示した。



型エクジステロイドの溶出時間と一致するエクジステロイドが、RIA活性を有するエクジステロイドとして、フラクシオンナンバー29-31 (15.0分), 53-59 (28.0分), 61-65 (31.5分) および80-83 (40.5分) に4種類検出され (図5), そして、RIA活性は示されないが (図5, フラクシオンナンバー145-149, [73.5分]), UV吸収を有するピーク (UV吸収のデータ省略) として、1種類検出された。これら5種類のエクジステロイドの抗体に体する反応性は、いずれも遊離型エクジステロイド分画にて新たに検出されたエクジステロイドと一致していた。以上のことから、各々の含有量に違いがあるが、5種類の新たに検出されたエクジステロイドは抱合型としても存在していることが明らかとなった。

次に、これら5種類の新たに検出された抱合型エクジステロイドが、既知の6種類の抱合型エクジステロイドと同様に、リン酸型のエクジステロイドであるかどうか、調べるために、実験材料および方法の項で述べた手順によって得た抱合型エクジステロイド分画を (1 g [湿重量] に相当) をalkaline phosphataseにて加水分解し、同一条件下のRP-HPLC (システム1) /RIAにて分析した。その結果、図5と同様の結果を得た (データは省略)。このことから、これら5種類の新たに検出された抱合型エクジステロイドはいずれも、リン酸基を有するエクジステロイドであると明らかとなった。

次に、カイコ卵巣内の抱合型エクジステロイド分画から、これら5種類の新たに検出された抱合型エクジステロイドを、分子種ごとに分離するために、それぞれのHPLC上での溶出位置を調べた。まず、10 g (湿重量) に相当する抱合型エクジステロイド分画 (材料と方法に示した手順に従い抽出) をセミ分取用のRP-HPLC (システム3) にて分離した (図6) と、HPLC上で溶出時間が、35.6 分, 40.0 分, 52.5 分, 56.4 分, 63.2 分, 70.0 分のピークは抱合型エクジステロイドの標準物質 (20E22P, E22P, 2d20E22P, 2dE22P, 2,22d20E-3P, B3P) の溶出時間と一致した。また、これら6種類の卵エクジステロイド

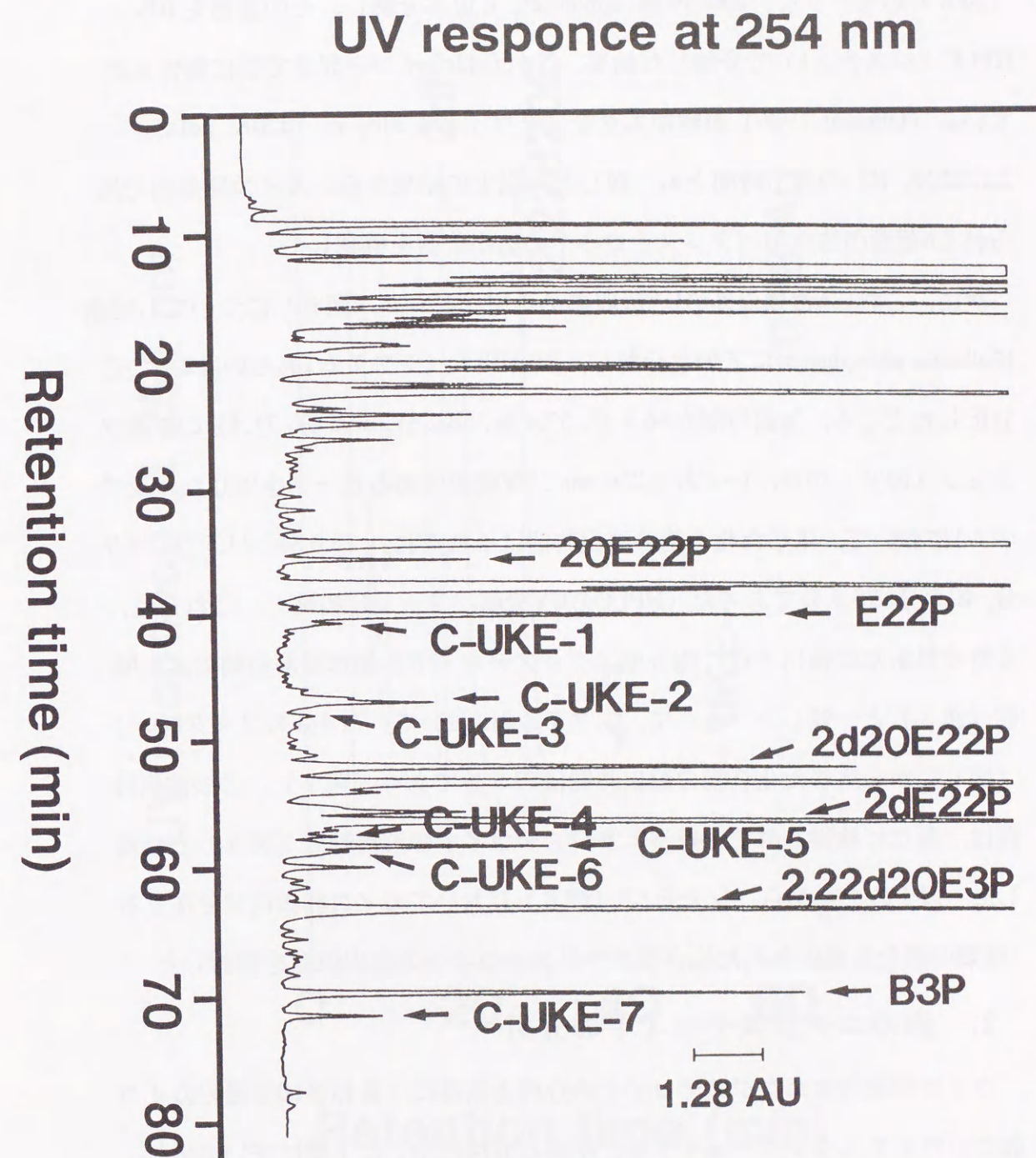


図6 成熟卵巣から抽出した抱合型エクジステロイドのHPLCパターン  
RP-HPLC (システム3) にて分離した。エクジステロイドは254 nmで検出した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。



(図6)のピークを, alkaline phosphataseにて加水分解し, その産物を RP-HPLC (システム1) で分離した結果, これらはカイコの卵巣で既に報告されている (Ohnishi, 1986) 遊離型エクジステロイド (20E, E, 2d20E, 2dE, 2,22d20E, B) の溶出時間とも一致した. 以上の結果から, カイコ卵巣内で知られる6種類の抱合型エクジステロイドの溶出位置を確認した.

次に, これら6種類以外のUV吸収のある主なピーク (図6) についても同様に alkaline phosphataseにて加水分解し, RP-HPLC (システム1あるいは2) にて分析したところ, 溶出時間が46.8分, 57.4分, 58.2分, 58.5分, 71.4分のフラクション (図6) から, いずれも254 nmにUV吸収のあるピークを生じた. システム1において, 生じた化合物の溶出時間はそれぞれ, 15.0分, 31.5分, 28.0分, 40.5分, 73.5分であった (HPLCのUV吸収パターンは省略). これらは, それぞれ新たに検出された抱合型エクジステロイドの加水分解産物の溶出時間 (図5) と一致した. さらに, システム2において, 71.4分のフラクション (図6) から生じた化合物の溶出時間は53.5分であり (図7), この溶出時間は, 新たに検出された遊離型エクジステロイドの溶出時間 (図4) と一致した. 以上のことから, システム3 (図6) においてカイコ卵巣内に存在する, 5種類の新たに検出された抱合型エクジステロイドの溶出位置を確認した.

## 2. 卵のエクジステロイドの分析

カイコ卵巣内のエクジステロイドの分析と同様に, 産卵後10日目のカイコ卵に存在するエクジステロイドを, 材料と方法に示した手順に従い抽出し, 抱合型エクジステロイドと遊離型エクジステロイドの分析を行った.

卵の抱合型エクジステロイド分画をセミ分取用のRP-HPLC (システム3) にて分離した (図8). HPLC上で溶出時間が, 32.8分, 42.5分, 54.0分, 57.8分, 64.4分, 71.3分のピークは抱合型エクジステロイドの標準物質 (20E22P, E22P, 2d20E22P, 2dE22P, 2,22d20E3P, B3P) の溶出時間と一致した. これら

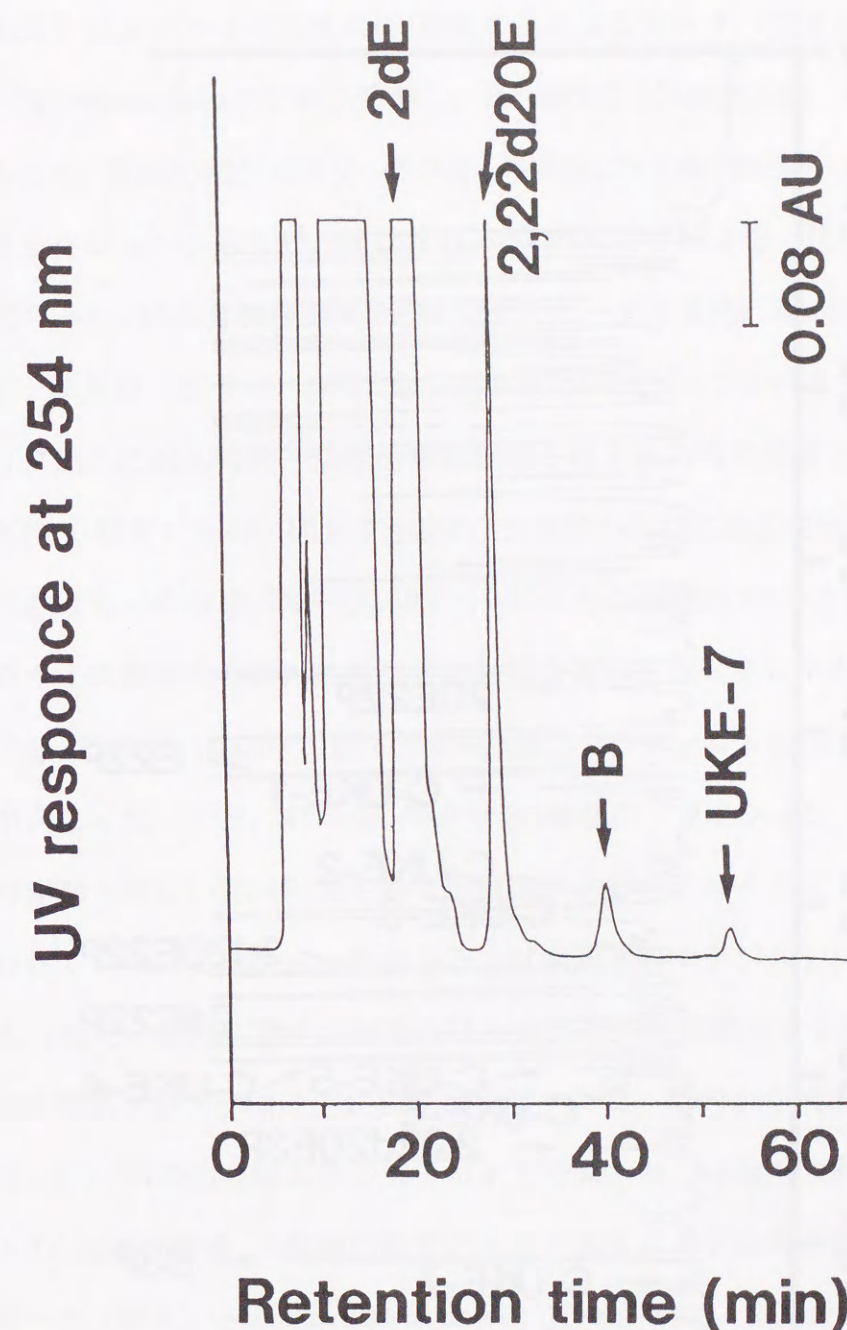


図7 成熟卵巣中の抱合型エクジステロイド (C-UKE-7) を加水分解した後に得られた遊離型エクジステロイドのHPLCパターン  
子牛の小腸由来のアルカリフォスファターゼにて加水分解し, 得られた遊離型エクジステロイドをRP-HPLC (システム2) にて分析した. 略号は本文参照.



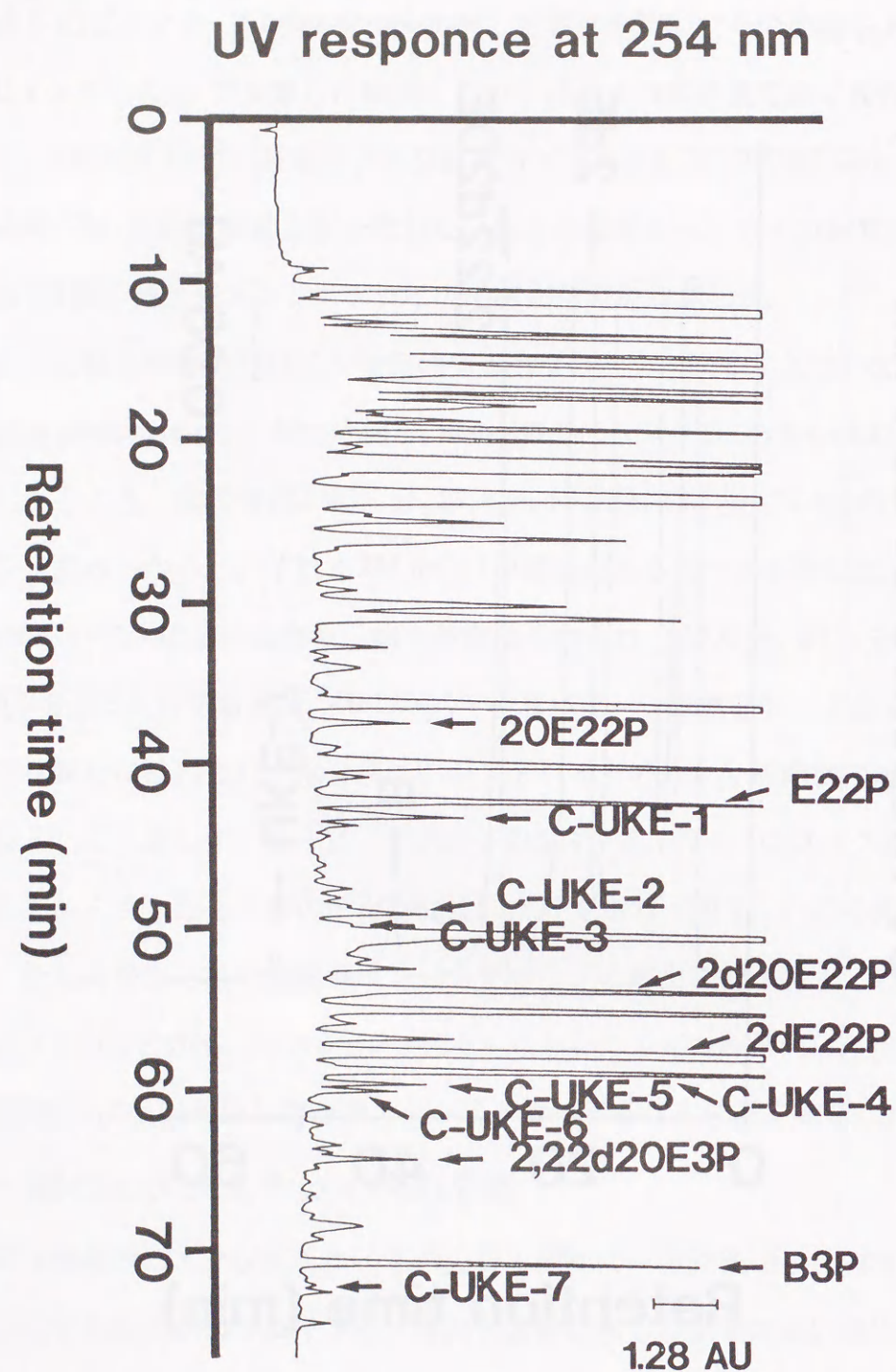


図8 休眠卵から抽出した抱合型エクジステロイドのHPLCパターン  
RP-HPLC（システム3）にて分離した。エクジステロイドは254 nmで検出した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。

の結果は、Mamiyaら（1995）のデータとよく一致していた。これら6種類の既知のエクジステロイド以外のUV吸収のある主なピーク（図8）についても同様に *H. pomatia* juiceにて加水分解し、RP-HPLC（システム4）／RIAにて分析したところ、溶出時間が43.3分、49.0分、49.8分、58.9分、59.5分、60.0分（図8）のフラクションから生じた化合物はRP-HPLCにて17.2分（図9-a）、14.9分（図9-b）、10.6分（図9-c）、31.5分（データは省略、Mamiya et al., 1995参照）、28.0分（図9-d）、65.5分（図9-e、システム1では41.0分に溶出、データは省略）に溶出した。加水分解産物のそれぞれの溶出位置と抗体に対する反応性（図9）から、図8で示された6種類の新たに検出されたエクジステロイドのうち、49.0分、58.9分、59.5分、60.0分の4種類のフラクションは、それぞれカイコ卵巣内の新たに検出された抱合型エクジステロイドである49.0分、58.9分、59.5分、60.0分（図6）の4種類のフラクションに相当することが明らかとなった。一方、43.3分、49.8分の2種類のフラクション（図8）の加水分解産物と等しい溶出時間を示す遊離型エクジステロイドは、卵巣内から検出されていないことから、新規あるいは未同定のエクジステロイドであると考えられた。また、カイコ卵巣の71.4分（図6）に溶出する新たに検出された抱合型エクジステロイドに相当するピークは、卵内から検出されなかった。

さらに、卵の抱合型エクジステロイド分画をセミ分取用のRP-HPLC（システム3）にて分離後、6種類の既知のエクジステロイド以外のUV吸収のある主なピーク（図8）をalkaline phosphataseにて加水分解し、RP-HPLC（システム4）／RIAにて分析した結果、それぞれ図9と同様の結果を得た（データは省略）。このことから、これら6種類の卵内の新たに検出された抱合型エクジステロイドはいずれも、リン酸基を有するエクジステロイドであると明らかとなった。

以上のカイコの卵巣や卵に含まれる新たに検出された抱合型エクジステロイドを溶出順に Conjugated unknown ecdysteroid-1, -2, -3, -4, -5, -6および7（以後、C-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3, C-UKE-4, C-UKE-5, C-UKE-6, C-UKE-7と



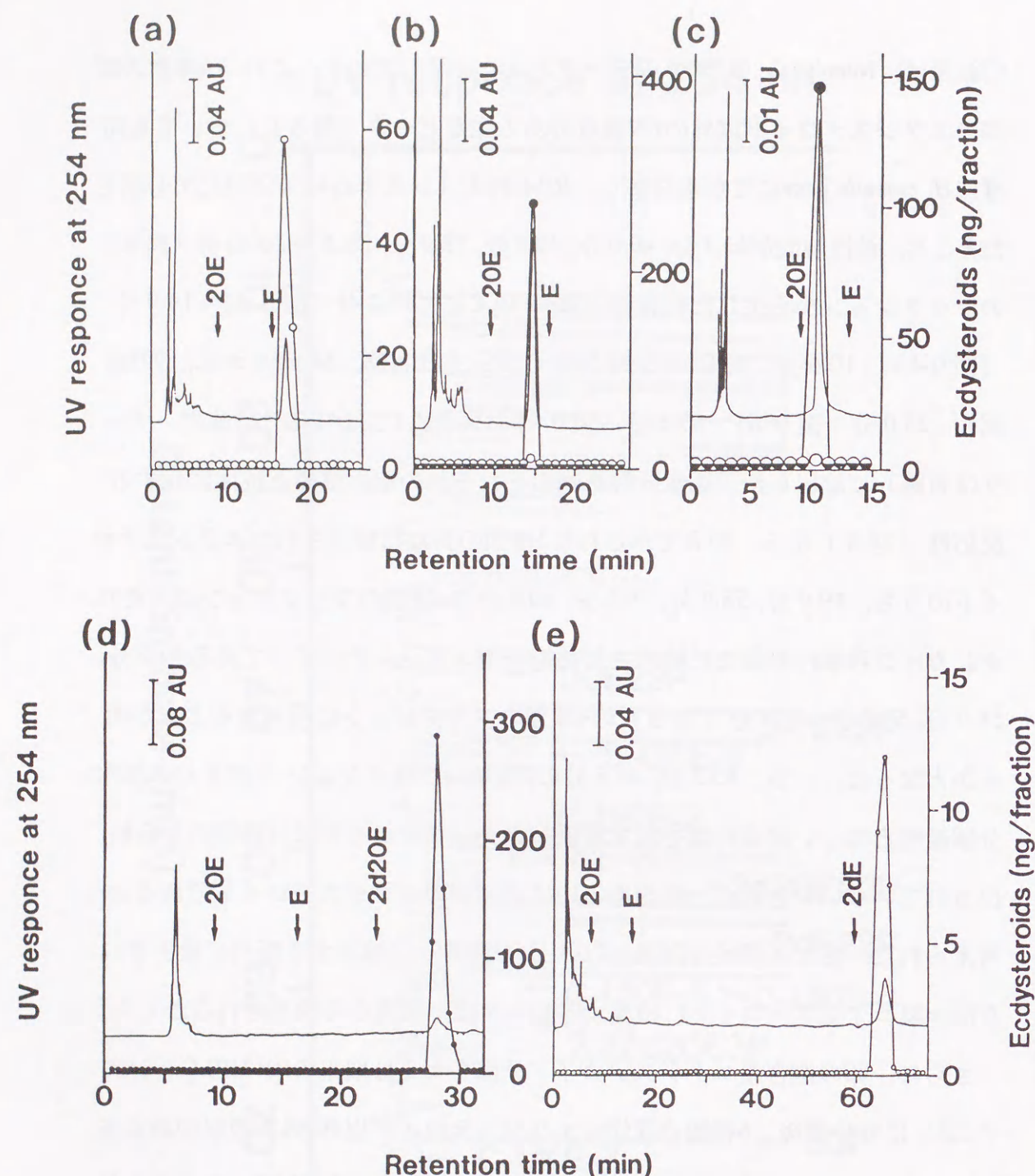


図9 休眠卵中の抱合型エクジステロイド (C-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3, C-UKE-5およびC-UKE-6) を加水分解した後に得られた遊離型エクジステロイドのHPLCパターン (a)はC-UKE-1を, (b)はC-UKE-2を, (c)はC-UKE-3を, (d)はC-UKE-5を, (e)はC-UKE-6を, *Helix pomatia* juiceにて加水分解し, 得られた遊離型エクジステロイドをRP-HPLC (システム4) にて分析した. エクジステロイドは254 nmで検出後, RIAにて定量し, エクジソン相当量で表した. 矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し, 略号は本文参照. S-3抗体は (○); H-22抗体は (●) で示した.

略す) と仮に呼ぶことにした (図6と8) .

次に, これらの新たに検出されたエクジステロイドが, 遊離型としても休眠卵中に存在しているかどうか調べるために, 同様の手順によって得た遊離型エクジステロイド分画 (1 g [湿重量] に相当) をRP-HPLC (システム1) / RIA (S-3抗体) にて分析した. その結果, フラクシオンナンバー35-36, 51-56, 57-63と82-84はC-UKE-1, C-UKE-5, C-UKE-4とC-UKE-6の加水分解産物の溶出時間と一致していた (図10) . そして, これらをH-22抗体によるRIAにて分析したところ, C-UKE-1の加水分解産物はH-22抗体にてほとんど検出されない (図11) ことと, C-UKE-5, C-UKE-4とC-UKE-6の加水分解産物はそれぞれ卵巣の遊離型エクジステロイド分画の分析 (図3) の結果と同様の反応性を示すこと (データは省略) が確かめられた. なかでも, C-UKE-6の加水分解産物は, 図3の結果と同様に2dEのピークのショルダー (図10) として検出された. 次に, C-UKE-2とC-UKE-3の加水分解産物の溶出時間と一致するフラクシオンとして, フラクシオンナンバー29-31と21に僅かなS-3抗体によるRIA活性を得た. しかし, H-22抗体による同様の分析の結果 (図11, システム4) , C-UKE-2とC-UKE-3の加水分解産物の溶出時間と一致するフラクシオンとして, フラクシオンナンバー27-32と19-23が得られた (図11) ことから, C-UKE-2とC-UKE-3は遊離型として存在することが確認された.

以上の結果から, カイコ卵内の抱合型として新たに検出された6種類のエクジステロイドは, 各々の含有量に違いがあるが, すべて遊離型としても存在することが明らかとなった. また, カイコの卵巣内の抱合型として検出されたが, 卵の抱合型としては検出されなかったC-UKE-7 (図6と8) は, 卵の遊離型としてフラクシオンナンバー146-148 (図10) にUV吸収を有するピークとして検出した (UV吸収のデータ省略, 後述する精製の章, 図12参照) .

以上のカイコの卵巣や卵に含まれる新たに検出された遊離型エクジステロイドをそれぞれの抱合型エクジステロイドに対応して, unknown ecdysteroid-1,



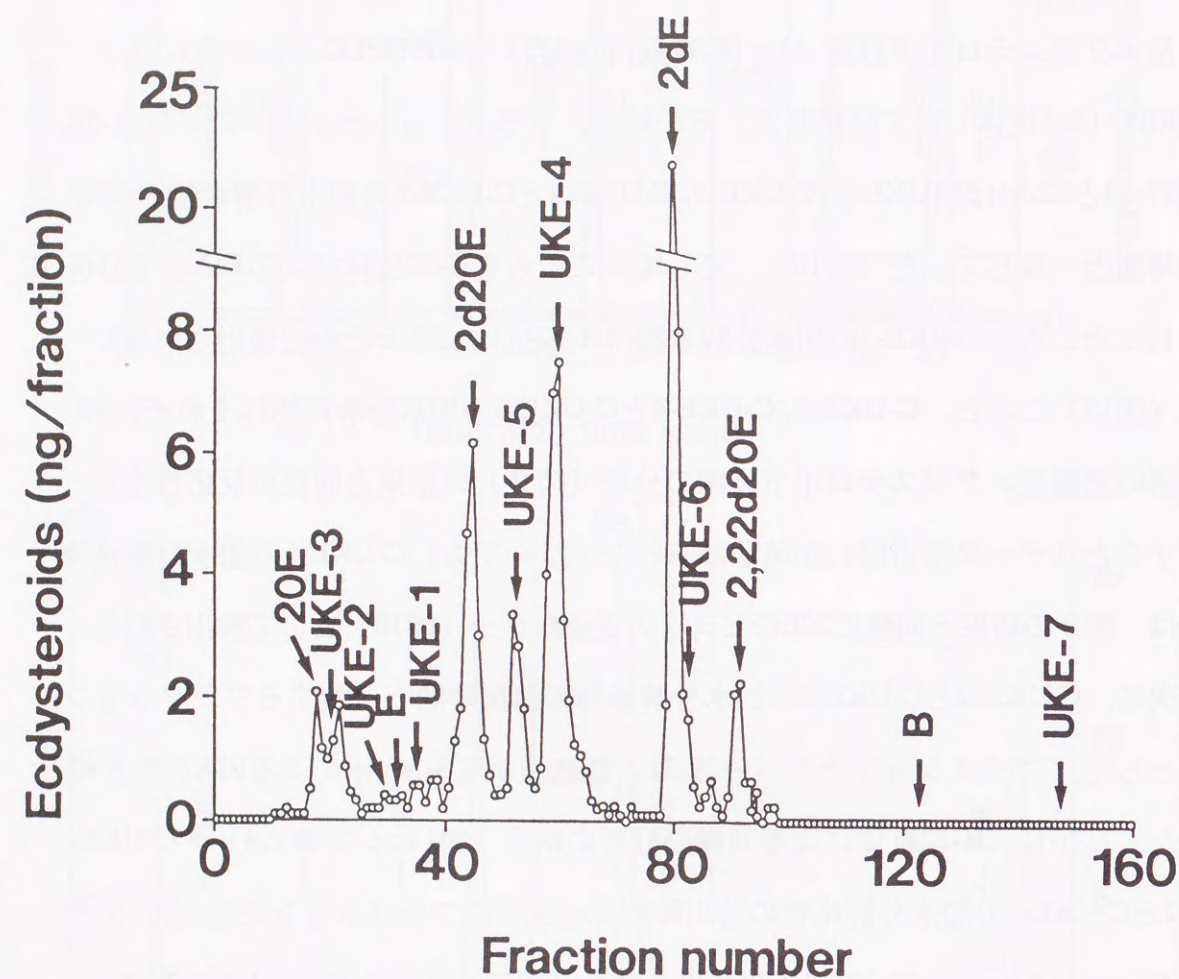


図 10 休眠卵から抽出した遊離型エクジステロイドの HPLCパターン  
RP-HPLC (システム 1) にて分離した。エクジステロイドはRIAにて定量し、エクジソン相当量で表した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。S-3抗体を (○) で示した。

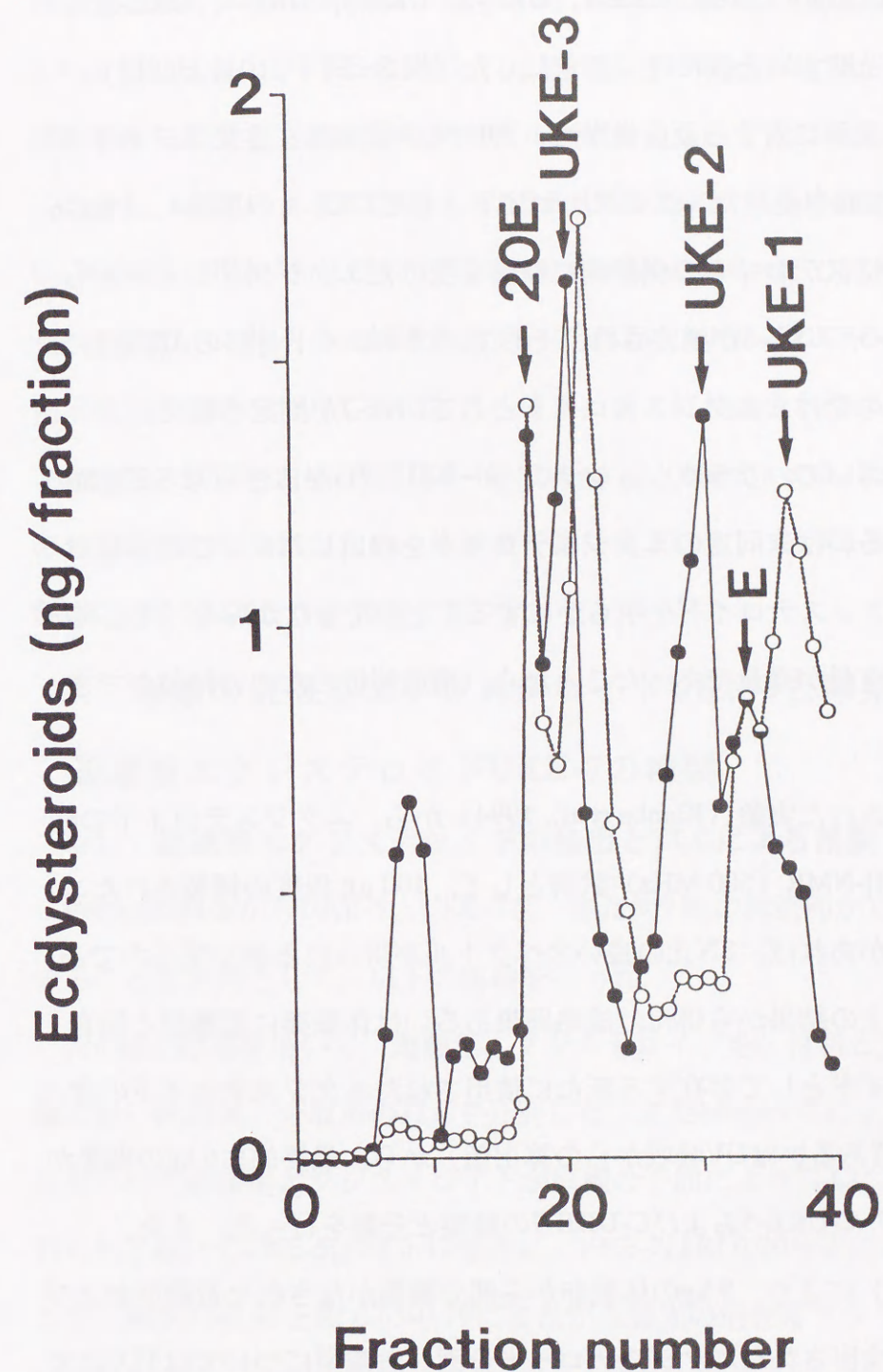


図 11 休眠卵から抽出した遊離型エクジステロイドの HPLCパターン  
RP-HPLC (システム 4) にて分離した。エクジステロイドはRIAにて定量し、エクジソン相当量で表した。矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し、略号は本文参照。S-3抗体は (○) ; H-22抗体は (●) で示した。



-2, -3, -4, -5, -6および7（以後, UKE-1, UKE-2, UKE-3, UKE-4, UKE-5, UKE-6, UKE-7と略す）と仮に呼ぶことにした（図3, 5, 7, 10および11）。また, これらの抗体に対する反応性から, 20EやEと比較し, 主にステロイド骨格のA環側に修飾を受けたエクジステロイドとしてUKE-1, UKE-4, UKE-6が推定され, 主にステロイドの側鎖側に修飾を受けたエクジステロイドとしてUKE-2, UKE-3, UKE-5が推定され, そして, ステロイド骨格のA環側および側鎖側に修飾を受けたエクジステロイドとしてUKE-7が推定された。

また, 図11において, フラクシオンナンバー7-11と21-24にさらなる2種類の遊離型の新規あるいは未同定のエクジステロイドを検出したが, これらに対応する抱合型エクジステロイドを明らかにすることができなかった。そして, いずれもその含有量が微量であったことから, 構造解析のための精製ができなかった。

これまでに示された実験（Kamba et al., 1994）から, エクジステロイドの構造解析には,  $[^1\text{H}]\text{-NMR}$ （500 MHz）試料として, 100  $\mu\text{g}$  程度の精製されたエクジステロイドがあれば, SN比の良いスペクトルが得られる事が明らかである。そこで, 以上の結果から得た, 成熟卵巣あるいは休眠卵に遊離型と抱合型エクジステロイドとして存在する新たに検出されたエクジステロイドの含有量（RIA検出値あるいはUV吸収からの算出値）から, 最終的に6 kgの卵巣からUKE-5, UKE-7, C-UKE-5およびC-UKE-7の精製と分離を行った。また, Mamiyaら（1995）により, 9 kgの休眠卵から部分精製がなされた遊離型および抱合型の新たに検出されたエクジステロイド分画（遊離型についてはTLCにて精製後  $R_f$  0.5-1.0にまたがる蛍光の消光帯 [後述の3章参照], 抱合型は図8の42.9分-53.5分および59.2分-63.0分に相当）を譲与していただき, これらよりUKE-7, C-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3およびC-UKE-6の精製と分離を行った。4種類の新たに検出されたエクジステロイドであるUKE-1, UKE-2, UKE-3およびUKE-6は, いずれも卵内で含有量が微量であるため（卵1 kgあたりエクジソン

相当量として, UKE-1は約1.2  $\mu\text{g}$  [図10], UKE-2は約3.1  $\mu\text{g}$  [図11], UKE-3は約3.9  $\mu\text{g}$  [図11] およびUKE-6は約1.7  $\mu\text{g}$  [図10]), 9 kgの休眠卵からは遊離型の構造解析に必要とされる量のサンプルが集まらないことが明らかとなった。

しかし, 前述のようにUKE-1, UKE-2, UKE-3およびUKE-6はC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3およびC-UKE-6をalkaline phosphataseにて加水分解しても得られるので, これらの分解産物を用いてUKE-1, UKE-2, UKE-3およびUKE-6の化学構造の解析を行うことにした。また, 新たに検出されたエクジステロイドのうち, UKE-4およびC-UKE-4はMamiya ら（Mamiya et al., 1995）によりその分離同定がなされたため, 本論文では, 以下においてUKE-4を22d20E'とC-UKE-4を22d20E'2Pと表記する。

### 3. 卵巣の遊離型エクジステロイドUKE-5と卵巣および卵の遊離型エクジステロイドUKE-7の精製

#### 3-1. 遊離型エクジステロイドの抽出とTLCによる精製

約6 kgの卵巣からUKE-5とUKE-7を, また約9 kgの休眠卵からUKE-7を精製することを目的として, 以下の実験を行った。

約6 kgの卵巣を用いて, 遊離型エクジステロイドを, 材料と方法に示した手順に従い抽出後, 分取用のTLCで分別した。またMamiyaらにより約9 kgの卵から得られた遊離型エクジステロイドが同様の手順によりTLCにて分別された。TLC上においてUKE-5は $R_f$  0.42付近に, UKE-7は $R_f$  0.70付近に展開された。そこで,  $R_f$  0.35-0.48と $R_f$  0.65-0.79にまたがる蛍光の消光帯（シリカゲル）をTLCより回収し, 各々 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (2:1, v/v)混液にてエクジステロイドを抽出した。

#### 3-2. UKE-5の精製

抽出液は, 減圧下で濃縮後, 約150 gの卵巣に相当量ごとに分析用のRP-HPLC（システム4）にて繰り返し分離した（20回, 図12-a）。HPLC上で溶出



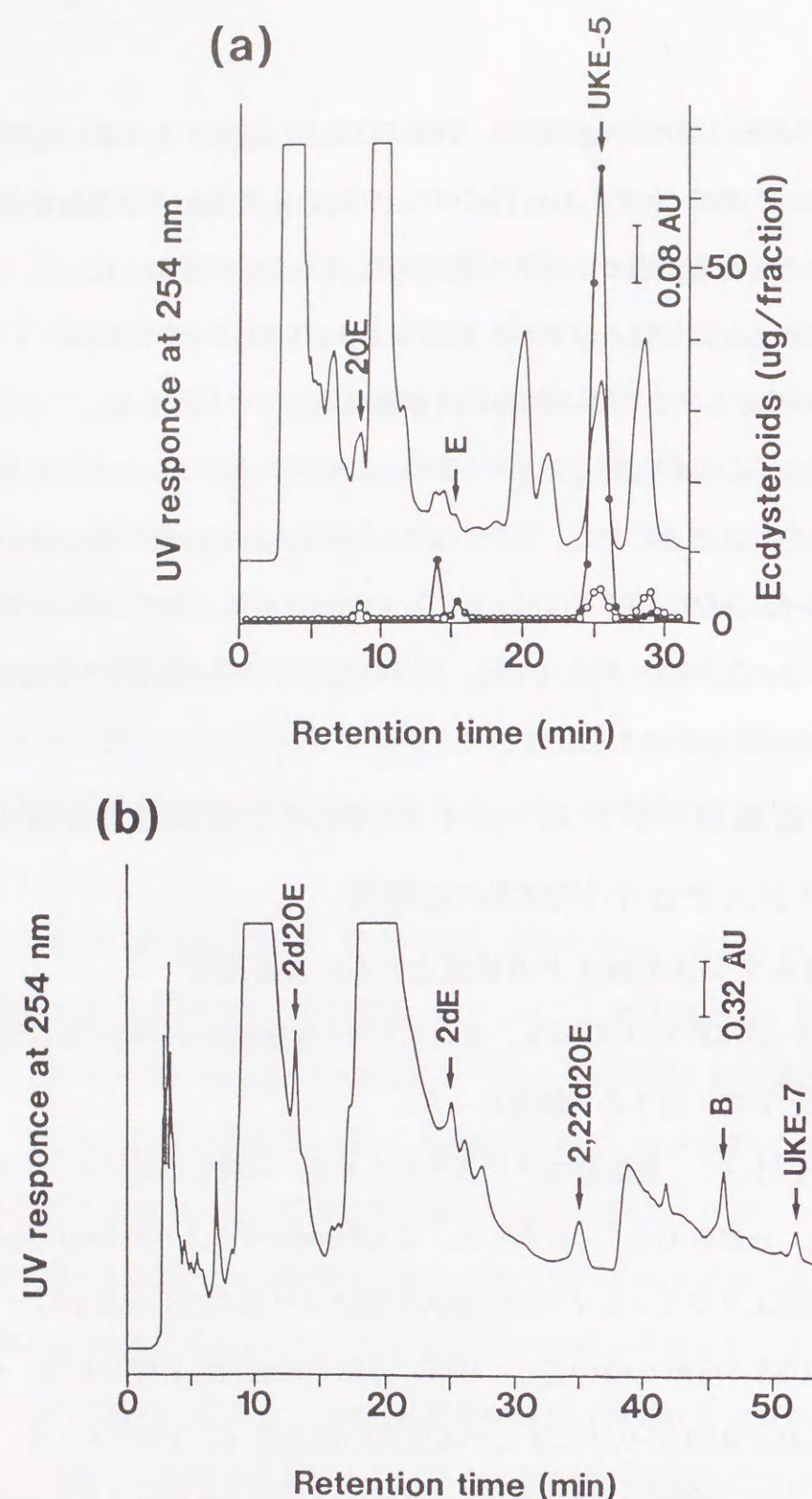


図 12 遊離型エクジステロイド (UKE-5, UKE-7) のHPLCによる部分精製パターン  
遊離型エクジステロイドはTLCにて精製後, RP-HPLC ((a)はシステム4, (b)はシステム8)にて分離し, 254 nmで検出した. (a)は, さらにRIAにて定量し, エクジソン相当量で表した. 矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し, 略号は本文参照. S-3抗体は (○); H-22抗体は (●) で示した.

時間が, UKE-5に相当するピーク (図12-aの24分から26.5分の溶出液) をすべて回収し, 蒸発乾固後, さらに約300 gの卵巣相当量ごとに同条件の分析用のRP-HPLC (システム4) にて再精製を2度行った. この精製段階でHPLC上で単一のピークとして得られたが, さらに移動相を変えて (システム5) 分析用のRP-HPLCにて精製した結果, 溶出時間46.6分の不純物, 51.5分のUKE-5, 58.9分の不純物の3つのピークに分離した. そこでUKE-5に相当するピーク (49.5分から53.2分の溶出液) をすべて回収し, 同条件の分析用のRP-HPLC (システム5) にて再精製を行い単一のピークを得た. さらに分析用のNP-HPLC (システム6 [図13-a, Eは11.48分に溶出, UKE-5は14.04分に溶出, 20Eは15.66分に溶出]と7 [Eは16.52分に溶出, UKE-5は18.29分に溶出, 20Eは23.45分に溶出], いずれも約1500 gの卵巣相当量) にても単一のピークであることを確かめた. 最終的に, 6 kgの卵巣から約150  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) のUKE-5を分離した.

### 3-3. UKE-7の精製

TLC精製後の抽出液は, 減圧下で濃縮後, 約150 gの卵あるいは卵巣相当量ごとに分析用のRP-HPLC (システム8) にて繰り返し分離した (卵巣由来のサンプル20回, 卵由来のサンプル60回 [図12-b]). HPLC上で溶出時間が, UKE-7に相当するピーク (50.8分から52.5分の溶出液) をすべて回収し (図12-b), 蒸発乾固後, さらに約300 gの卵巣相当量ごとに同条件の分析用のRP-HPLC (システム8) にて再精製を2度行い, UKE-7は単一のピークとして得られた. 次に, 分析用のRP-HPLC (システム3, 図13-b) と分析用のNP-HPLC (システム6 [UKE-5は3.46分に溶出, 2d20Eは7.41分に溶出]と7 [UKE-5は3.92分に溶出, 2d20Eは12.70分に溶出], いずれも約1500 gの卵巣相当量) にても単一のピークであることを確かめた. 最終的に, 6 kgの卵巣と9 kgの卵から約110  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) のUKE-7を分離した.



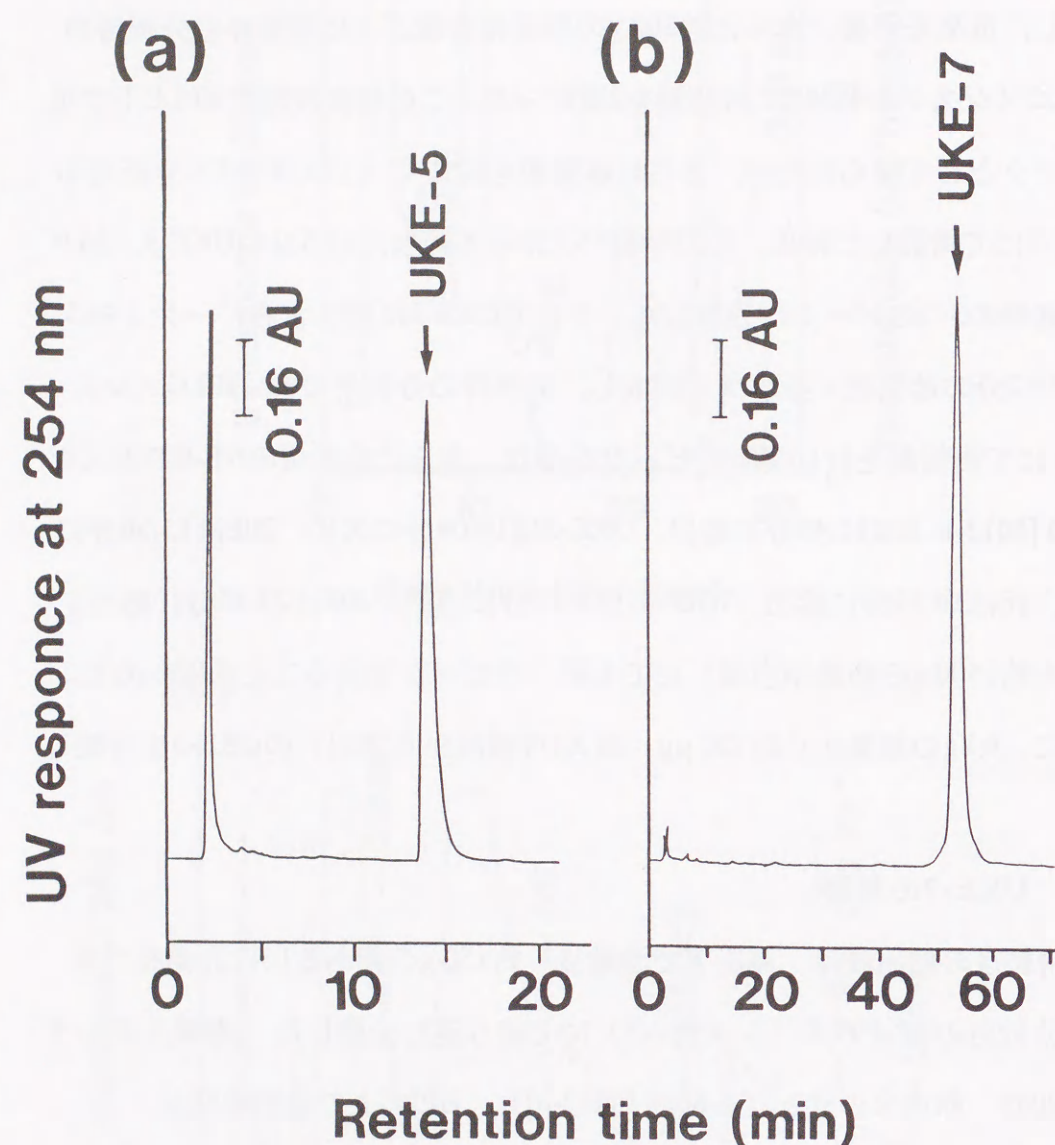


図 13 遊離型エクジステロイド (UKE-5, UKE-7) の最終精製段階のHPLCパターン  
(a)はRP-HPLC (システム6) にて得られたUKE-5のパターンを示している。(b)は(システム3) にて得られたUKE-7のパターンを示している。詳細は本文参照。

#### 4. 卵巣の抱合型エクジステロイドC-UKE-5およびC-UKE-7の精製

##### 4-1. 卵巣の抱合型エクジステロイドC-UKE-5およびC-UKE-7の分離

材料と方法に示した手順にて得た抱合型エクジステロイド分画を、卵巣150 g相当量ごとにセミ分取用のRP-HPLC (システム2) に供した。これらの抱合型エクジステロイドのHPLCパターンは10 g相当量の抱合型エクジステロイドのHPLCパターン (図3) に類似していた (図は省略)。

そこで、約6 kgの卵巣について20回のHPLCを行うことによってC-UKE-5とC-UKE-7に相当するピークを集めた。

##### 4-2. C-UKE-5の精製

C-UKE-5はさらに脱塩した後に2度目のセミ分取用のRP-HPLC (システム9) に供した (図は省略)。2度目のHPLCにおいても溶出時間37.80分と41.78分にUV吸収を有する不純物が確認された (C-UKE-2は39.74分に溶出) ために、さらに同条件のRP-HPLC (システム9) にて精製し、C-UKE-5の単一のピークを得た (図14-a)。最終的に約390  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

##### 4-3. C-UKE-7の精製

RP-HPLC (システム2) から得られたC-UKE-7についても、脱塩した後に2度目のRP-HPLC (システム10, 2,22d20E) は21.6分に溶出, B3Pは35.2分に溶出, C-UKE-7は41.6分に溶出) に供し、最後に、3度目のRP-HPLC (システム11) にて単一のピークを得た (図14-b)。C-UKE-7は最終的に約180  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

#### 5. 卵の抱合型エクジステロイドC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3およびC-UKE-6の精製

##### 5-1. 卵の抱合型エクジステロイドC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3およびC-UKE-6の分離



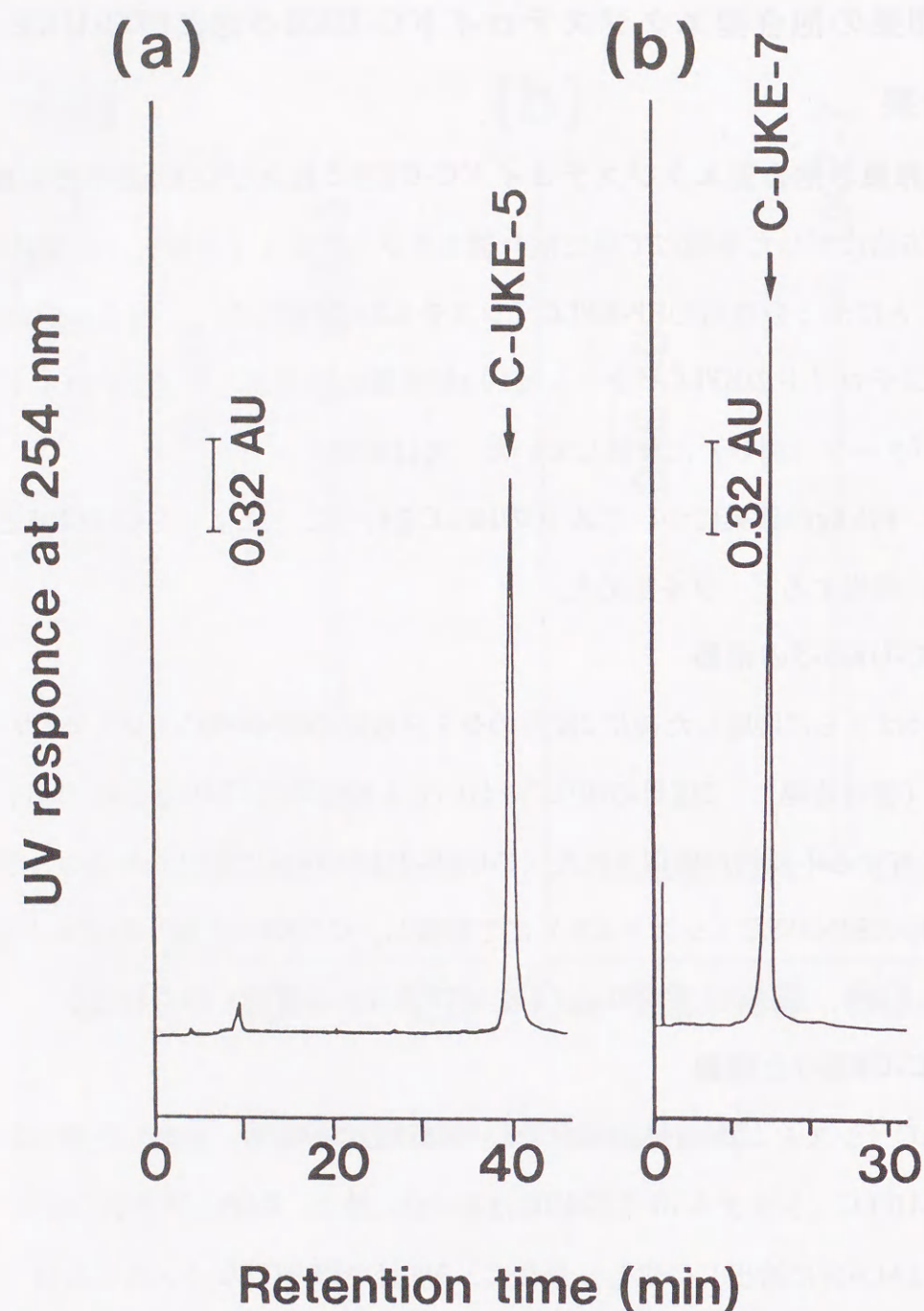


図 14 抱合型エクジステロイド (C-UKE-5, C-UKE-7) の最終精製段階のHPLCパターン  
(a)はRP-HPLC (システム9) にて得られたC-UKE-5のパターンを示している。(b)は(システム11) にて得られたC-UKE-7のパターンを示している。詳細は本文参照。

前述の約6 kgの卵巣から抱合型エクジステロイドの分離の方法と同様の手順にて, Mamiyaら (1995) により, 約9 kgの卵から抱合型エクジステロイド分画部分精製後, セミ分取用のRP-HPLC (システム1) により分別されたC-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3およびC-UKE-6に相当するフラクション (図8の42.9分-53.5分および59.2分-63.0分に相当) を使用した。

### 5-2. C-UKE-1の精製

C-UKE-1 (図8の42.9分-45.0分に相当) はさらに脱塩した後に2度目のセミ分取用のRP-HPLC (システム9, 9 kg, 60回) に供した (図15-a)。2度目のHPLCにおいてもUV吸収を有する不純物が確認された (C-UKE-1は20.12分に溶出) ため, C-UKE-1に相当するピークを回収し, さらに同条件のRP-HPLC (システム9, 9 kg, 60回) にて精製し, C-UKE-1は単一のピークとして得た。しかし, 次にセミ分取用のRP-HPLC (システム12, 9 kg, 50回) にて精製した結果, 溶出時間40.93分の不純物, 31.77分のC-UKE-1, 44.84分の不純物の3つのピークに分離した (図は省略)。そこでC-UKE-1に相当するピークを回収し, 同条件のセミ分取用のRP-HPLC (システム12) にて再精製を行い単一のピークを得た (図16-a)。最後に分析用のRP-HPLC (システム13, 9 kg, 3回) にて精製した結果, 単一のピークを確認した (E22Pは5.00分に溶出, C-UKE-1は6.40分に溶出, 2d20E 22Pは10.00分に溶出)。最終的に約180  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

### 5-3. C-UKE-2の精製

RP-HPLC (システム3) から得られたC-UKE-2 (図8の45.0分-49.5分に相当) についても, 脱塩した後に2度目のセミ分取用のRP-HPLC (システム9, 9 kg, 75回) に供した (図15-b)。2度目のHPLCにおいてもUV吸収を有する不純物が確認された (C-UKE-2は25.79分に溶出) ため, C-UKE-2に相当するピークを回収し, さらに同条件のRP-HPLC (システム9, 9 kg, 15回) にて精製し, C-UKE-2は単一のピークとして得た。しかし, 次にセミ分取用のRP-HPLC



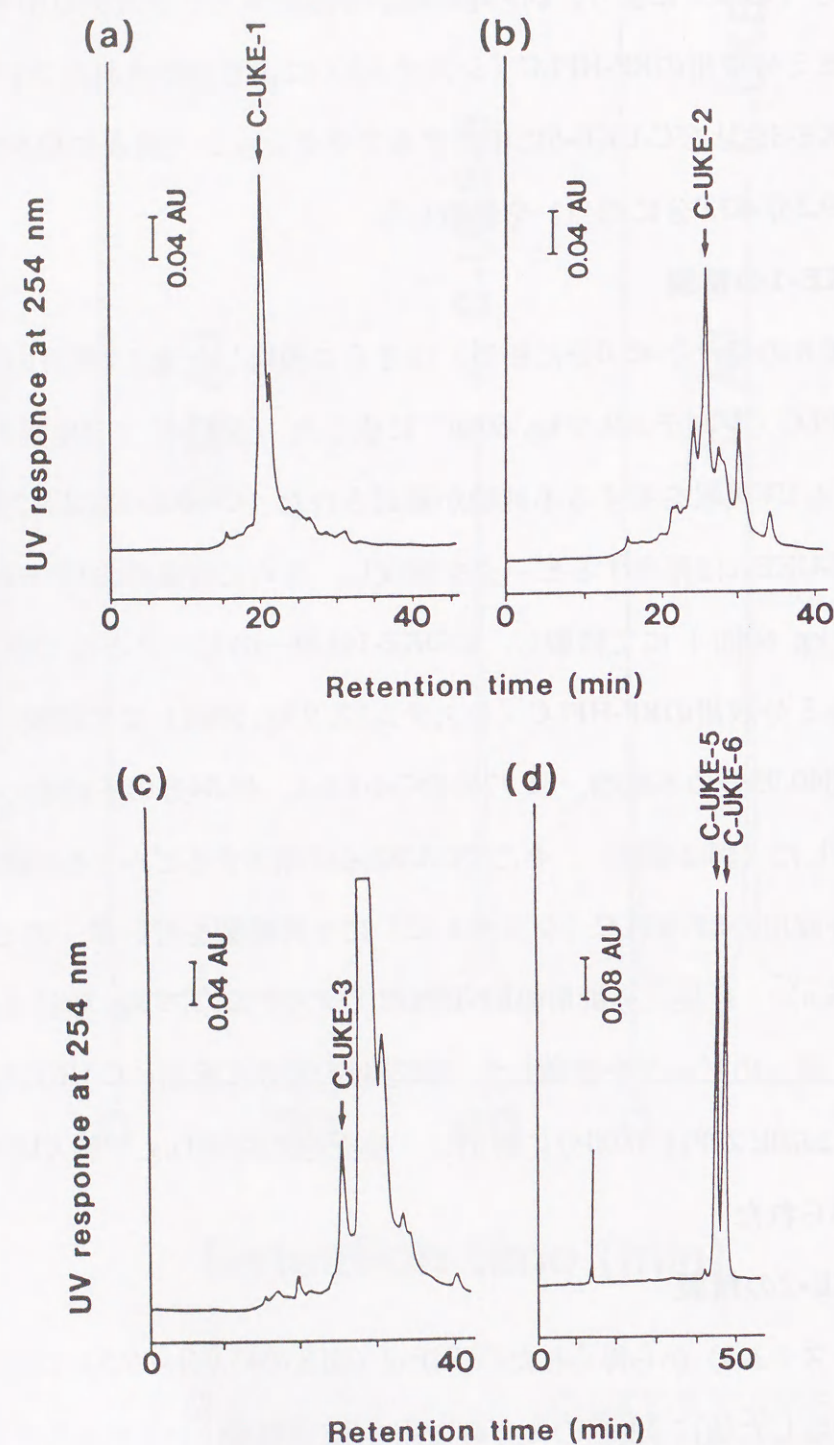


図 15 休眠卵中の抱合型エクジステロイド (C-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3 および C-UKE-6) の HPLC による部分精製パターン  
(a) は図 8 の C-UKE-1 を, (b) は C-UKE-2 を, (c) は C-UKE-3 を, (d) は C-UKE-6 を分取した後に, さらに RP-HPLC (システム 9) にて各々精製した. エクジステロイドは 254 nm で検出した. 矢印はエクジステロイドの溶出位置を示し, 略号は本文参照.

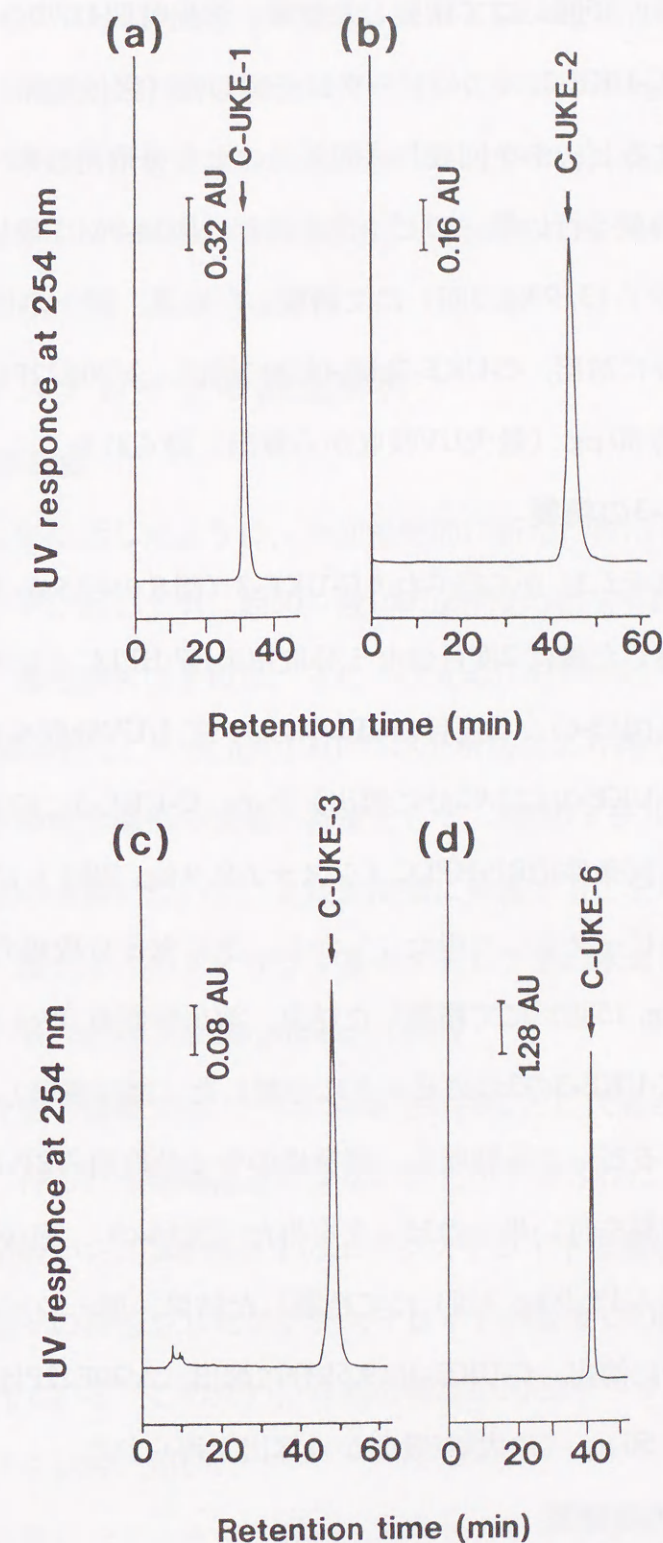


図 16 抱合型エクジステロイド (C-UKE-1, C-UKE-2, C-UKE-3 および C-UKE-6) の最終精製段階の HPLC パターン  
(a) は RP-HPLC (システム 12) にて得られた C-UKE-1 のパターンを示している. (b) は (システム 12) にて得られた C-UKE-2 のパターンを示している. (c) は RP-HPLC (システム 12) にて得られた C-UKE-3 のパターンを示している. (d) は (システム 9) にて得られた C-UKE-6 のパターンを示している. 詳細は本文参照.



(システム12, 9 kg, 15回) にて精製した結果, 溶出時間41.90分と43.10分の不純物, 44.00分のC-UKE-2の3つのピークに分離した(図は省略)。そこでC-UKE-2に相当するピークを回収し, 同条件のセミ分取用のRP-HPLC(システム12) にて再精製を行い単一のピークを得た(図16-b)。最後に分析用のRP-HPLC(システム13, 9 kg, 3回) にて精製した結果, 単一のピークを確認した(E22Pは5.00分に溶出, C-UKE-2は8.44分に溶出, 2d20E22Pは10.00分に溶出)。最終的に約 80  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

#### 5-4. C-UKE-3の精製

RP-HPLC(システム3) から得られたC-UKE-3(図8の49.5分-53.5分に相当) についても, 脱塩した後に2度目のセミ分取用のRP-HPLC(システム9, 9 kg, 90回) に供した(図15-c)。2度目のHPLCにおいてもUV吸収を有する不純物が確認された(C-UKE-3は25.92分に溶出) ため, C-UKE-3に相当するピークを回収し, さらに同条件のRP-HPLC(システム9, 9 kg, 10回) にて精製し, C-UKE-3は単一のピークとして得た。しかし, 次にセミ分取用のRP-HPLC(システム12, 9 kg, 15回) にて精製した結果, 溶出時間41.39分と45.47分の不純物, 48.50分のC-UKE-3の3つのピークに分離した(図は省略)。そこでC-UKE-3に相当するピークを回収し, 同条件のセミ分取用のRP-HPLC(システム12) にて再精製を行い単一のピークを得た(図16-c)。最後に分析用のRP-HPLC(システム13, 9 kg, 3回) にて精製した結果, 単一のピークを確認した(E22Pは5.00分に溶出, C-UKE-3は9.69分に溶出, 2d20E22Pは10.00分に溶出)。最終的に約 50  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

#### 5-5. C-UKE-6の精製

RP-HPLC(システム3) から得られたC-UKE-6(図8の59.2分-63.0分に相当) についても, 脱塩した後に2度目のセミ分取用のRP-HPLC(システム9, 9 kg, 50回) に供した(図15-d)。2度目のHPLCにおいてC-UKE-6の直前にC-UKE-5が確認されたため, C-UKE-6に相当するピークを回収し, さらに同条件のRP-

HPLC(システム9, 9 kg, 10回) にて精製し, C-UKE-6は単一のピークとして得た(図16-d)。最後に分析用のRP-HPLC(システム13, 9 kg, 3回) にて精製した結果, 単一のピークを確認した(2d20E22Pは10.00分に溶出, C-UKE-5は13.97分に溶出, C-UKE-6は14.72分に溶出)。最終的に約 564  $\mu$ g (最大UV吸収から算出) 得られた。

### 6. エクジステロイドの構造解析

#### 6-1. 構造解析法

上述の精製結果に示したように, 今回最終的に新たに検出されたいずれのエクジステロイドにおいても, 約50~数100  $\mu$ g程度の標品を得た。これらの標品の重量から, 構造解析の手段は, 主に一次元の $^1\text{H}$  NMR分析法と数種類のMS分析法に制限される。一次元の $^1\text{H}$  NMR分析法により得られる一般的なエクジステロイドの化学構造の情報の特徴として, 5個のメチル基と7位, 3位, 2位, 22位, 9位の水素について, 比較的簡単に帰属することが出来ることが知られ, 一方, ほとんどのメチリジン基やメチレン基の水素は判読しがたい事も知られている(Horn and Bergamasco, 1985)。

このように今回の分析では,  $^{13}\text{C}$  NMR分析法などに代表される他のNMR分析法と比較し, 得られる情報は遥に少ないことが予想された。しかし, これまで動植物界全般から, 200種以上のエクジステロイドの構造解析がなされており, これら様々の構造をしたエクジステロイドの数多くの $^1\text{H}$  NMRデータが既に報告されている。このため, 今回の標品のNMRデータの判読に際し, これらのデータを比較に用いた。

また, 後述の節に示すように, 幾つかの既知のエクジステロイドは, 新規あるいは未同定のエクジステロイドと同一条件下にてNMRスペクトルを測定し, 比較に用いた。

#### 6-2. UKE-5の構造解析



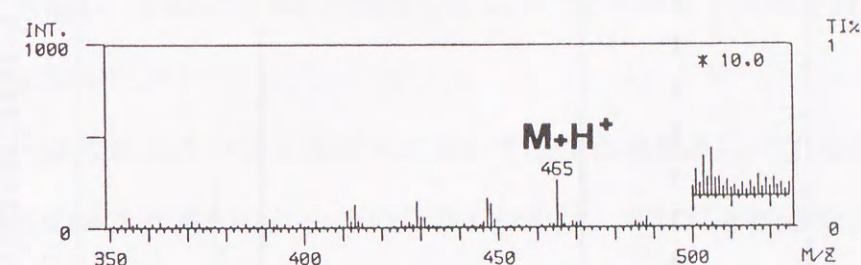
まず, UKE-5はポジティブイオンFAB-MSスペクトル(図17-a)において $m/z$  465に $M+H$ , さらに $m/z$  447に $M+H-H_2O$ ,  $m/z$  429に $M+H-H_2O \times 2$ および $m/z$  411に $M+H-H_2O \times 3$ イオンピークが認められたことから, 本品の分子量は464 Daであると決定した. この値は代表的なエクジステロイドとして知られるEや既にカイコの卵巣内のエクジステロイドとして報告されている2d20E (Ohnishi et al., 1981) の値と一致していた.

次に, 図18にUKE-5の $[^1H]$  NMRデータ(重メタノール中)を示す. その $[^1H]$  NMRスペクトルでは, 5個のメチル基 ( $\delta$  0.852 ppm [43.85 %,  $CH_3$ ],  $\delta$  0.961 ppm [40.23 %,  $CH_3$ ],  $\delta$  1.185 ppm [100 %,  $CH_3 \times 2$ ],  $\delta$  1.280 ppm [41.12 %,  $CH_3$ ]), 2個のオキシメチン水素(水酸基の付け根の水素,  $\delta$  3.84 ppmと3.95 ppm), 1個分のオレフィン水素( $\delta$  5.81 ppm, doublet)のシグナルが明瞭に示された. まず, 既知の化合物のデータ(196種のエクジステロイドのNMRデータの記載 [Lafont and Wilson, 1992]) からエクジステロイドの典型的な7-one-6-en構造を有する化合物の7位のオレフィン水素は, この溶媒において, 約 $\delta$  5.63 ppmから5.98 ppmの領域に示されることが明らかである.

また初期の研究から, ステロイド骨格のうち, A環とB環の立体配置が $5\alpha$ -型(trans-union)であれば, 7位の水素の形状がsingletとして示され, 反対にA環とB環の立体配置が $5\beta$ -型(cis-fusion)であれば, 7位の水素の形状がdoublet ( $J=2.5Hz$ ) として示されることも明らかである (Smith and Newsoroff, 1974). 以上のことから, UKE-5のNMRデータに示されたオレフィン水素は, 7位の水素に帰属され, さらにUKE-5は典型的な $5\beta$ -型であり, かつ6-en-7-one構造を有するエクジステロイドであると確認された.

さらに, UKE-5のメチル基とオキシメチン水素を帰属するために, 既にX線結晶解析法にてその構造が明らかにされ (Dammeier and Hoppe, 1971), そして $[^1H]$  NMRについて詳細に研究されている (Girault and Lafont, 1988) 代表的なエクジステロイドである20E標品の $[^1H]$  NMRスペクトル(重メタノール中)

(a)



(b)

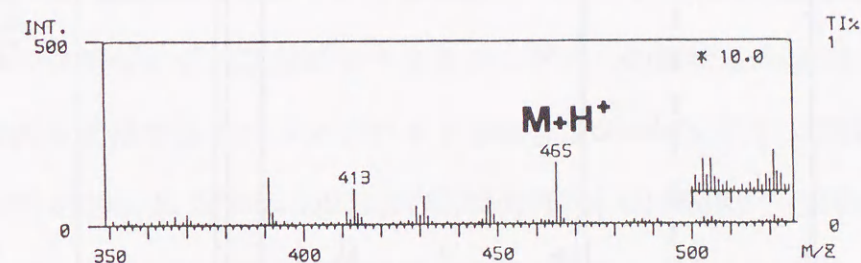


図 17 遊離型エクジステロイドのポジティブFAB-MSスペクトル

(a)は成熟卵巣から精製した遊離型エクジステロイド(UKE-5)のMSスペクトルを示している. (b)はイチイ由来の22d20EのMSスペクトルを示している. 溶媒にメタノール, マトリックスにはグリセロールを使用した. 測定領域は, 0 ~ 1200 M/Zとし, 図には350 ~ 525 M/Zを示した.



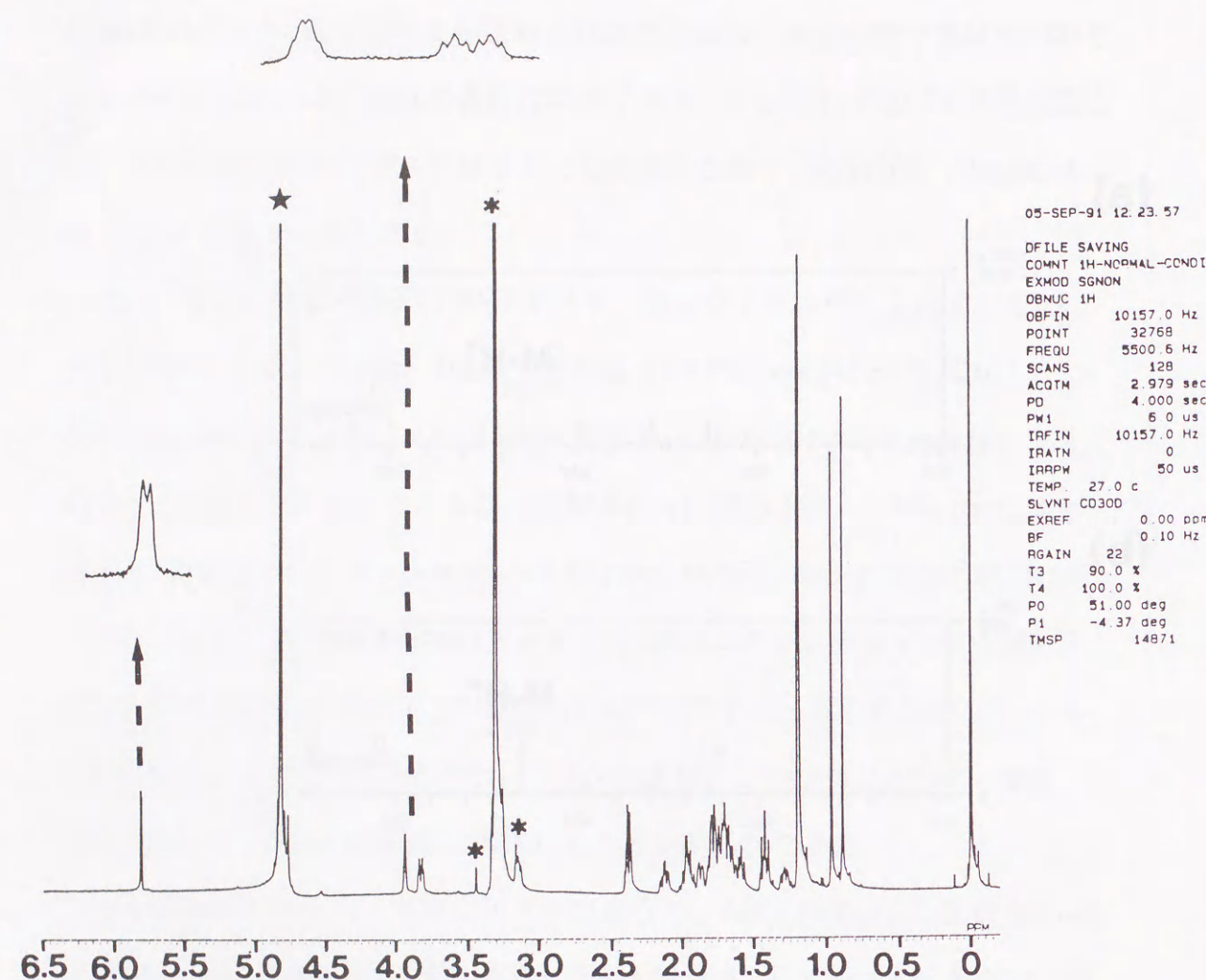


図 18 成熟卵巣から精製した遊離型エクジステロイド (UKE-5) の 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 溶媒には重メタノールを使用した。基準物質に TMS を使用した。  
 (★) は溶媒に由来するシグナルを示している。(★) はサンプル内に混入している  $\text{H}_2\text{O}$  シグナルを示している。点線の矢印は、スペクトル内のシグナルにおいて、より詳細な形状を明らかにするために、それぞれの拡大図を示している。

を UKE-5 と同一条件下にて測定し、UKE-5 のデータと比較した。20E のステロイド骨格部に関するシグナル、特に 2 位と 3 位の水素の化学シフトと形状が、UKE-5 の 2 つのオキシメチン水素 ( $\delta$  3.84 ppm と 3.95 ppm) とよく一致し、そして 18 位と 19 位のメチル基の化学シフトと形状が UKE-5 の 2 個のメチル基とよく一致していた。したがって、これら UKE-5 の 4 個のシグナルを 20E に対応する水素に帰属し、UKE-5 は 20E と類似したエクジステロイド骨格を有することが明らかとなった。

また、既知のエクジステロイドにおいて 20 位に水酸基を有する化合物の 18 位と 21 位のメチル基のシグナルの化学シフトは、20 位に水酸基を欠損する化合物のそれぞれの化学シフトに比べ、低磁場に示されることが明らかである (Hampshire and Horn, 1966)。そして重メタノール内では 20 位に水酸基を有するエクジステロイドの 21 位のメチル基のシグナルの形状は singlet を示し、20 位に水酸基を欠損するエクジステロイドの場合は doublet を示す (既報 [Ohnishi et al., 1989] の 20E, E, 2d20E, 2dE および 2,22d20E の  $^1\text{H}$  NMR データ参照) ことも明らかである。UKE-5 の場合、18 位のメチル基のシグナルの化学シフトが 20E と一致し、21 位のメチル基のシグナルが singlet を示している。以上のことから、UKE-5 は 20 位に水酸基を有するエクジステロイドであることが明らかとなった。

次に、UKE-5 の帰属されていない 3 個のメチル基のうち、同じ位置 ( $\delta$  1.185 ppm) に化学シフトを示す 2 個のメチル基を、既報の多種のエクジステロイドの例 (Lafont and Wilson, 1992) において、26 位と 27 位のメチル基の化学シフトが等しいか、あるいは極めて近似した位置に示される (多くのエクジステロイドの場合、側鎖上の 26 位と 27 位の水素の環境は極めて等しいことからこの結果は容易に推定される) ことから、同様に 26 位と 27 位に帰属した。

最後に、 $\delta$  1.28 ppm のメチル基は 21 位に帰属した。このメチル基のシグナルの形状は singlet であり、これは上述の UKE-5 が 20 位に水酸基を有するという結果と矛盾しない。以上のことから、UKE-5 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (重メタノール



ール中, 図18) を以下のように帰属した. UKE-5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) のデータ:  $[\text{H}]$  NMR  $\delta$ : 0.852 (s, 18-Me), 0.961 (s, 19-Me), 1.185 (s, 26/27-Me), 1.280 (s, 21-Me), 3.83 (m,  $w1/2=22\text{Hz}$ , 2-H), 3.94 (m,  $w1/2=8\text{Hz}$ , 3-H) および 5.81 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 7-H).

しかし, 帰属したUKE-5の21位のメチル基は20Eと同様にsingletを示したが, その化学シフトは約0.1 ppm低磁場にシフトしていることから, UKE-5の21位の近傍の構造は20Eと異なることが明らかとなった. また, UKE-5の26位と27位のメチル基の化学シフトと形状は2,22d20Eの既報のデータとよく一致することと, UKE-5の分子量から, UKE-5は20Eの22位の水酸基を欠損している化合物の22d20E (22-deoxy-20-hydroxyecdysone) であると考えられた. UKE-5が22d20Eである場合, UKE-5のデータには20Eに示されるような22位のオキシメチン水素を欠損していることが推定されたが, この溶媒内において20Eの22位の水素が示される領域の解析は, 強い溶媒シグナルのため不可能であった.

しかし, 22d20EはNakanoら(1982)によって, イチイ *T. cuspidata* の乾燥葉から既に単離され, 構造が決定されているため, 著者は約1.5 kgのイチイ葉から実験材料および方法に示した手順にて22d20Eを精製し, 再結晶後, 最終的に350 mgの22d20Eの標品を得た. この標品のポジティブイオンFAB-MSスペクトル(図17-b)はM+Hイオンピークを含め, UKE-5(図17-a)とよく一致した. そして, 1.0 mgの22d20E標品をUKE-5と同一条件下で $[\text{H}]$  NMRにて測定し, そのNMRスペクトルとUKE-5のデータと比較した. その結果, 両者の $[\text{H}]$  NMRデータ(重メタノール中)はよく一致した.

さらにUKE-5, イチイ由来の22d20Eそして20Eを重水内で測定し, それぞれの $[\text{H}]$  NMRスペクトルを比較した結果, 同様にUKE-5と22d20Eのデータ (UKE-5 ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $[\text{H}]$  NMR  $\delta$ : 0.820 (s, 18-Me), 0.997 (s, 19-Me), 1.227 (2s, 26/27-Me), 1.304 (s, 21-Me), 3.10 (m,  $w1/2=22\text{Hz}$ , 9-H), 3.99 (m,  $w1/2=21\text{Hz}$ , 2-H), 4.07 (m,  $w1/2=8\text{Hz}$ , 3-H) および 5.97 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 7-H), イチイ由来の

22d20E標品のNMRデータは省略) はよく一致した. そして20Eのデータでは, 22位のオキシメチン水素が示されたが ( $\delta$  3.43 ppm), UKE-5のデータと22d20Eのデータにおいては, いずれもスペクトル上のこの領域に22位のオキシメチン水素のシグナルの欠損が確認された.

以上の実験結果から, UKE-5の構造は22d20Eであることが明らかとなった(図19).

### 6-3. C-UKE-5の構造解析

前節で述べた22d20E (UKE-5) の抱合型であるC-UKE-5は, ネガティブイオンFAB-MSスペクトル(図20-a)において $m/z$  543にM-Hイオンピークが認められたことから, 本品の分子量は544 Daであると決定した. この値は既にカイコの卵巣内のエクジステロイドとして報告されているE22Pや2d20E22P (Ohnishi et al., 1989) の値と一致していた. また22d20Eの分子量(464 Da)との差から, C-UKE-5は22d20Eのモノリン酸エステルと考えられた.

次に, C-UKE-5は22d20Eと $[\text{H}]$  NMRデータ(重水中)を直接比較した. その結果, C-UKE-5の $[\text{H}]$  NMRスペクトルでは, 5個のメチル基, 2個のオキシメチン水素, 1個のメチン水素, 1個分のオレフィン水素のシグナルがUKE-5と同様に明瞭に示された. スペクトル上の水素の数, それぞれの化学シフトと形状は3位の水素以外, UKE-5と極めて良く一致していた.

以上のことから, C-UKE-5の $[\text{H}]$  NMRスペクトルを以下のように帰属した. C-UKE-5 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) のデータ:  $[\text{H}]$  NMR  $\delta$ : 0.811 (s, 18-Me), 0.994 (s, 19-Me), 1.218 (2s, 26/27-Me), 1.293 (s, 21-Me), 3.09 (m,  $w1/2=22\text{Hz}$ , 9-H), 3.93 (m,  $w1/2=21\text{Hz}$ , 2-H), 4.44 (m,  $w1/2=12\text{Hz}$ , 3-H) および 5.97 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 7-H).

C-UKE-5の3位のオキシメチン水素はUKE-5と比較し, 約0.37 ppm低磁場にシフトし, またその形状(半値巾)は8 Hzから12 Hzに拡大していることが確認された. これら3位に関する差異を含めた22d20EとC-UKE-5の $[\text{H}]$  NMRとMSデータより, C-UKE-5は22d20Eの3位( $\beta$ 位)にリン酸基を有する化合物の



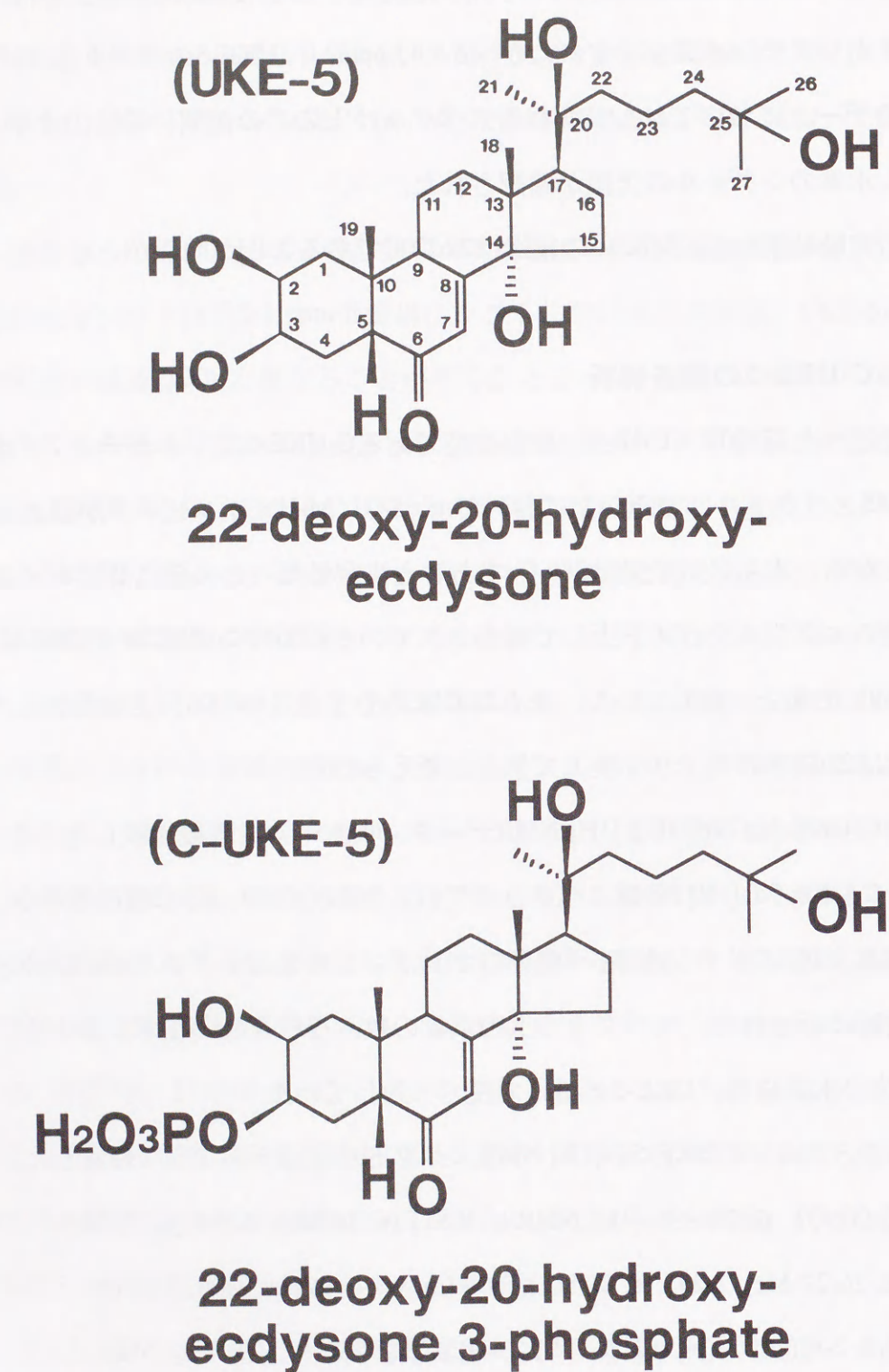
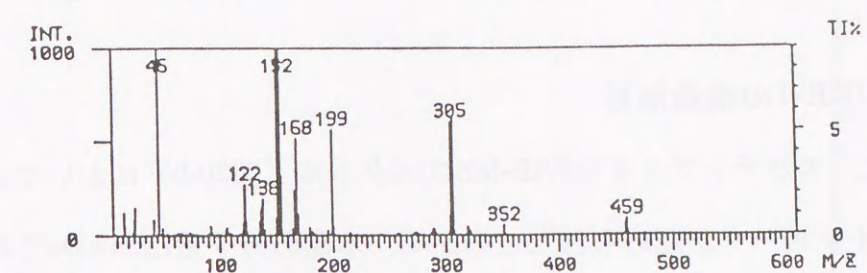
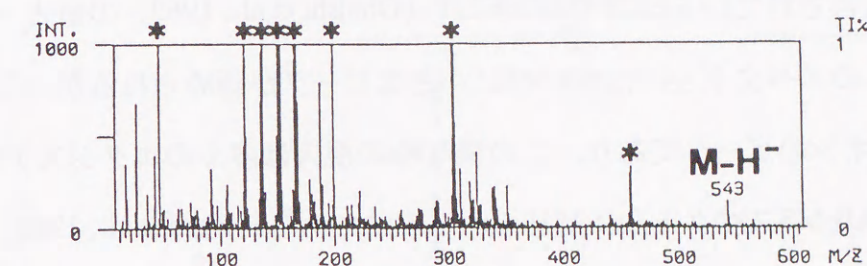


図 19 カイコの卵エクジステロイドとして同定された遊離型エクジステロイドと決定された抱合型エクジステロイドの構造

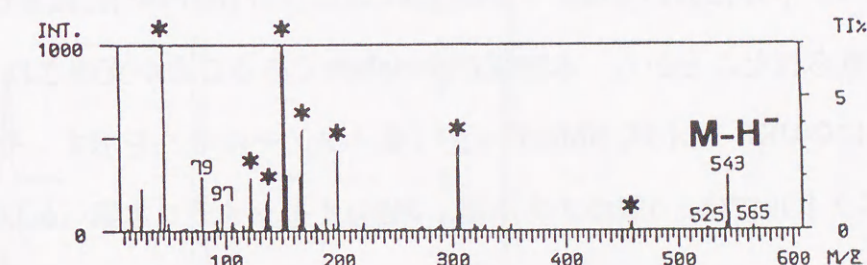
(back ground)



(a)



(b)



(c)

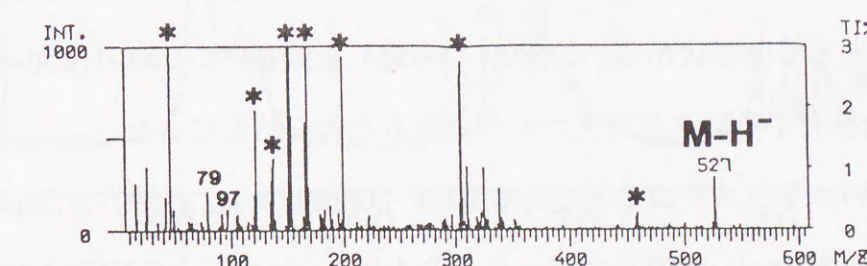


図 20 抱合型エクジステロイド (C-UKE-5, C-UKE-1, C-UKE-6) のネガティブFAB-MSスペクトル  
マトリックスにはNBAを使用した. back groundはサンプルと比較のためにマトリックスを測定した. (a)はC-UKE-5の, (b)はC-UKE-1の, (c)はC-UKE-6のMSスペクトルを示している. (\*)はマトリックス由来のピークを示している. 測定領域は, 0 ~ 1200 M/Zとし, 図には0 ~ 600 M/Zを示した.



22d20E3P (22-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-phosphate) であると結論づけられた (図19)。

#### 6-4. C-UKE-1の構造解析

C-UKE-1は、ネガティブイオンFAB-MSスペクトル (図20-b) において  $m/z$  543にM-Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は544 Daであると決定した。この値は上述の22d20E3Pや既にカイコの卵巣内のエクジステロイドとして報告されているE22Pや2d20E22P (Ohnishi et al., 1989) の値と一致していた。このスペクトルには  $m/z$  565に小さなピークが認められるが、これはM+Na-Hイオンのピークであり、このようなNaの混入は多くのエクジステロイド化合物のFAB-MSスペクトルに認められる現象である (Isaac et al., 1982)。このピークの存在からもC-UKE-1の分子量は544 Daであることが確かめられた。さらにこのスペクトルにおいて  $m/z$  79 [ $\text{PO}_3^-$ ]  $m/z$  および97 [ $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ] に顕著なイオンピークが見られたことから、本物質がphosphateであることが支持された。

次に、図21にC-UKE-1の $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中) を示す。その $^1\text{H}$  NMRスペクトルでは、5個のメチル基、2個のオキシメチン水素 ( $\delta$  3.64 ppmと4.20 ppm)、1個のメチン水素 ( $\delta$  3.09 ppm, m) と1個分のオレフィン水素 ( $\delta$  5.82 ppm, d) のシグナルが明瞭に示された。まず1個分のオレフィン水素の化学シフトとその形状から、22d20E (6-2節) と同様にC-UKE-1は5 $\beta$ -型の6-en-7-one構造を有するエクジステロイドであると明らかとなった。

次に、既知のエクジステロイドであるE22P (Ohnishi et al., 1989) と3-epi-postosterone (Rudel et al., 1992) のデータ (重メタノール中) とC-UKE-1のデータの比較に基づいて各メチル基とメチン水素の帰属を行った。その結果は表1に示した。C-UKE-1のデータはE22Pのデータと各メチル基および22位の水素 ( $\delta$  4.20 ppm) の化学シフトがよく一致していた。このことからC-UKE-1は、Eと同じ側鎖構造をもち、22位のphosphateであることが示された。2位あるいは3位の水素と考えられるシグナルが $\delta$  3.64 ppmに1H分観察され、その半

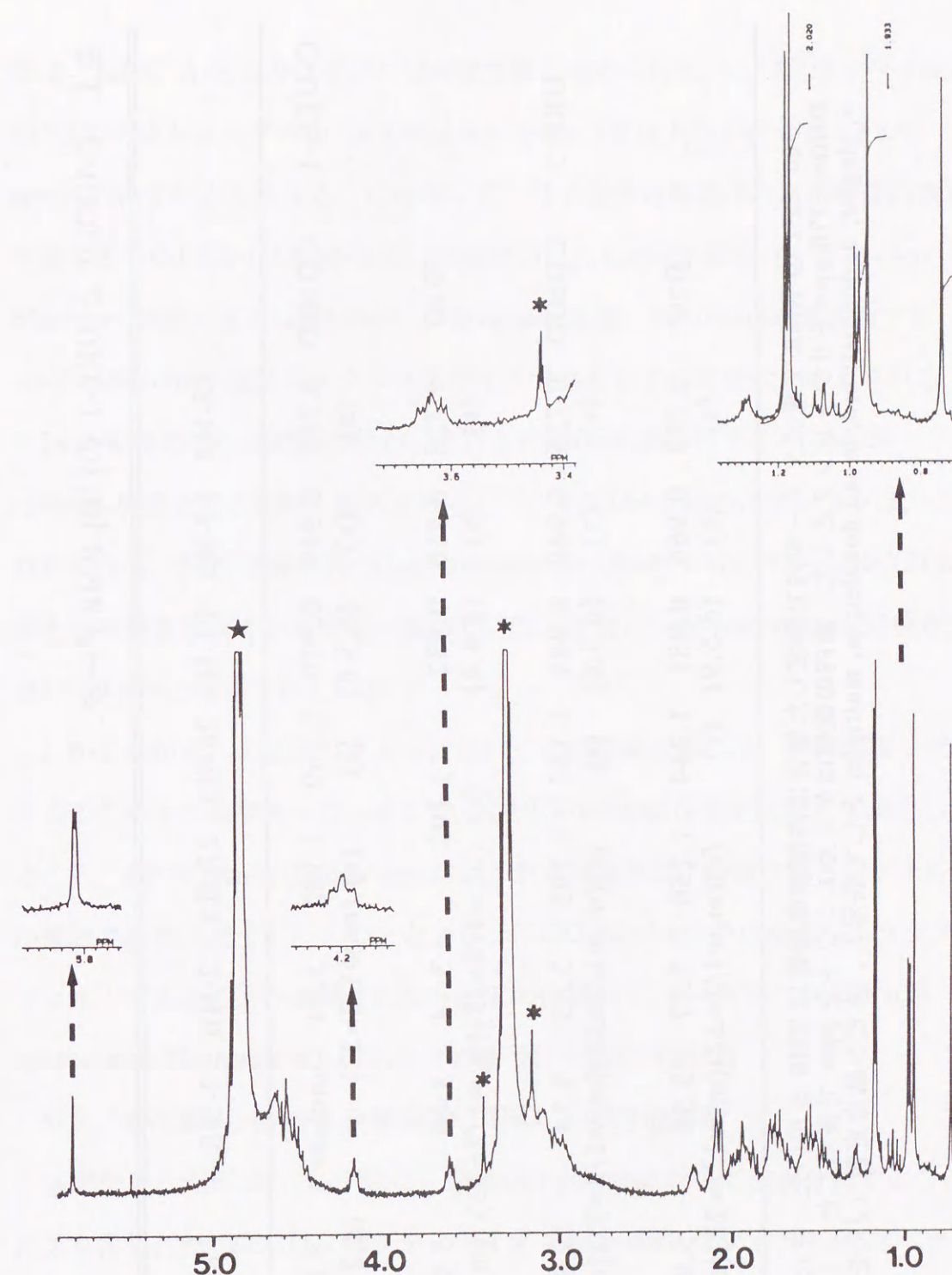


図21 休眠卵から精製した抱合型エクジステロイド (C-UKE-1) の500 MHz  $^1\text{H}$  NMRスペクトル  
溶媒には重メタノールを使用した。基準物質にTMSを使用した。  
(\*)は溶媒に由来するシグナルを示している。(★)はサンプル内に混入している $\text{H}_2\text{O}$ シグナルを示している。点線の矢印は、スペクトル内のシグナルにおいて、より詳細な形状を明らかにするために、それぞれの拡大図を示している。



値巾（22Hz）からこのシグナルはaxial水素と考えられた。この化学シフトはEの2位のプロトンシグナル（ $\delta$  3.84 ppm）と3位のプロトンシグナル（ $\delta$  3.95 ppm）のいずれとも異なる。したがって、分子量から推定される水酸基の数も考慮するとC-UKE-1は3-epi-（2位と3位がいずれもaxial水素を有する2 $\beta$ -,3 $\alpha$ -dihydroxy-構造）または2,3-diepi-（2位equatorial水素, 3位がaxial水素を有する2 $\alpha$ -,3 $\alpha$ -dihydroxy-構造）エクジステロイド骨格を有する可能性が考えられる（2-epi-骨格の場合は2位と3位がいずれもequatorial水素を有する2 $\alpha$ -,3 $\beta$ -dihydroxy-構造となるため、除外される）。上記 $\delta$  3.64 ppmの化学シフトは、これらのうち、3-epi-骨格を持つ3-epi-postosterone（Rudel et al., 1992）の2位の水素として報告されている値と一致していた。なお、3-epi-postosteroneの3位水素は $\delta$  3.40 ppmと報告されている。

しかしながら、上記スペクトルにおいてこの領域の解析は、強い溶媒シグナルのため不可能であった。そこで、C-UKE-1の溶媒を重水に変えて測定したところ、 $\delta$  3.74 ppm及び $\delta$  3.46 ppmにいずれもaxial水素に帰属されるシグナルが確認された（表1）。このことより、C-UKE-1は3-epi-骨格をもつエクジステロイドであることが確認された。以上の結果から、C-UKE-1はE'22P（3-epi-ecdysone 22-phosphate）であると結論づけられた（図22）。

6-5. C-UKE-1の加水分解産物、UKE-1の構造解析

前節で述べたE'22P（C-UKE-1）をalkaline phosphataseにて加水分解することにより得られたUKE-1は、ポジティブイオンFAB-MSスペクトル（MSスペクトルは省略）においてm/z 465にM+Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は464 Daであると決定した。この値は既報（Dinan and Rees, 1978）に示された合成標品のE'の値と一致していた。

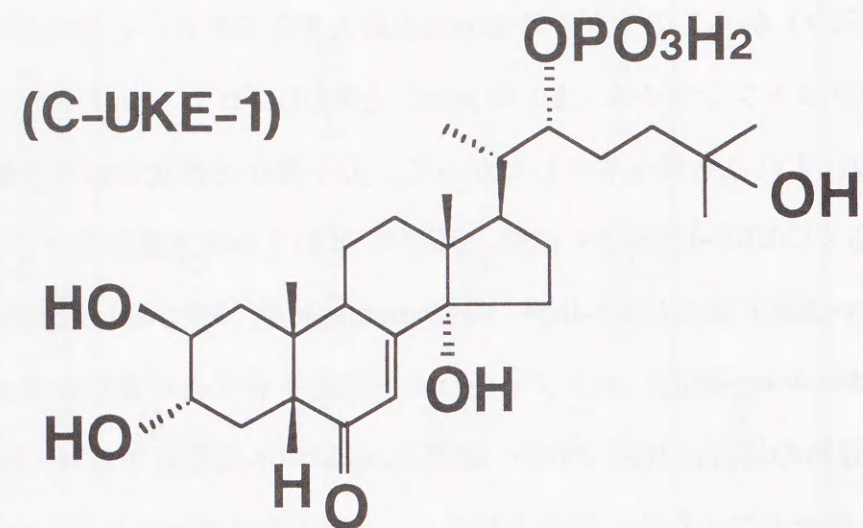
次に、UKE-1はE'22Pと $[^1\text{H}]$  NMRデータ（重メタノール中、表1）を直接比較した。両者のNMRスペクトルは前述の22d20Eと22d20E3Pとの比較（6-3節）と同様にほとんどのシグナルの化学シフトと形状の一致が確認され、また

表 1 C-UKE-1 と UKE-1 の $[^1\text{H}]$  NMRデータ.

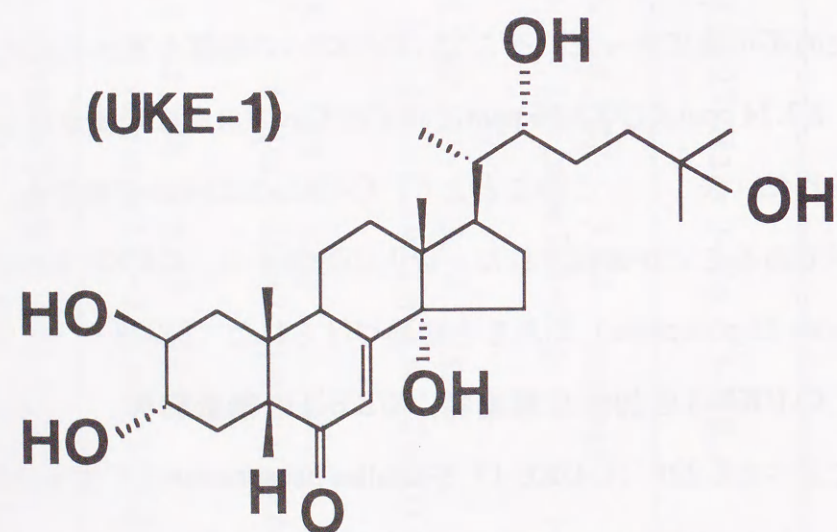
		18-H $\beta$	19-H $\beta$	21-H $\beta$	26-H $\beta$	27-H $\beta$	2-H $\alpha$	3-H $\beta$	7-H	9-H $\alpha$	22-H
C-UKE-1	CD <sub>3</sub> OD	0.740 (s)	0.949 (s)	0.979 (d,5.8)	1.169 (s)	1.182 (s)	3.64 (m,w1/2=22)	unclear	5.82 (d,2.4)	3.09 (m)	4.20 (m,w1/2=19)
	D <sub>2</sub> O	0.728 (s)	0.958 (s)	0.932 (d,6.4)	1.202 (s)	(m,w1/2=22)	3.74 (m,w1/2=23)	3.46 (m)	5.96 (m)	3.07 (m)	4.08 (m,w1/2=23)
UKE-1	CD <sub>3</sub> OD	0.725 (s)	0.949 (s)	0.944 (d,5.6)	1.185 (s)	1.193 (s)	3.63 (m,w1/2=21)	3.34 (m,w1/2=21)	5.82 (d,2.4)	3.17 (m)	3.59 (brd,10.6)
	D <sub>2</sub> O	0.757 (s)	0.966 (s)	0.981 (d,5.9)	1.244 (s)	1.250 (s)	3.77 (m,w1/2=22)	3.51 (m,w1/2=22)	5.99 (m)	3.11 (m)	3.71 (brd,10.0)

500 MHz の NMR で重メタノール内で測定した場合は内部標準物質に TMS を用いた。また、重水内で測定した場合は DHO=4.770 ppm をリファレンスとした。表内の数値はケミカルシフトを ppm で表示した。( ) 内はシグナルの形状を s, singlet; d, doublet; brd, broad doublet; m, multiplet として表示し、スピン結合定数 (J) を Hz で表示した。





**3-epi-ecdysone  
22-phosphate**



**3-epi-ecdysone**

図 22 カイコの卵エクジステロイドとして同定された抱合型エクジステロイドと遊離型エクジステロイドの構造

UKE-1の22位の水素はE'22P (C-UKE-1として記載)の22位の水素と異なる $\delta$  3.59 ppmに観察されたことから, C-UKE-1の22位のリン酸基が加水分解されたことが支持された. なお, この化学シフトはEの22位の水素と同じである. さらに, 重水中のスペクトルのUKE-1の2位および3位の水素の化学シフトはC-UKE-1の対応する水素と同じであった(表1). 以上の結果から, UKE-1はE' (3-epi-ecdysone)であると結論づけられた(図22).

#### 6-6. C-UKE-6とその加水分解産物, UKE-6の構造解析

C-UKE-6は, ネガティブイオンFAB-MSスペクトル(図20-c)においてm/z 527にM-Hイオンピークが認められたことから, 本品の分子量は528 Daであると決定した. C-UKE-6をalkaline phosphataseにて加水分解することにより得られたUKE-6は, ポジティブイオンFAB-MSスペクトル(MSスペクトルは省略)においてm/z 449にM+Hイオンピークが認められたことから, 本品の分子量は448 Daであると決定した. したがって, UKE-6はEより水酸基のひとつ少ないエクジステロイドであり, C-UKE-6はそのモノリン酸エステルと考えられた.

次に, 図23にC-UKE-6の $[^1\text{H}]$  NMRデータ(重メタノール中)を示す. その $[^1\text{H}]$  NMRスペクトルでは, 5個のメチル基, 2個のオキシメチン水素( $\delta$  3.64 ppmと4.20 ppm), 1個分のオレフィン水素( $\delta$  5.82 ppm, d)のシグナルが明瞭に示された. まず1個分のオレフィン水素の化学シフトとその形状から, 5 $\beta$ -型の6-en-7-one構造を有するエクジステロイドであると明らかとなった.

そしてC-UKE-1 (E'22P, 6-4節, 表1), C-UKE-6および既報のEのデータ(Ohnishi et al., 1989)との比較に基づいて各メチル基とメチン水素の帰属を行った. その結果はC-UKE-6のNMRデータ(重メタノール中, 表2)をE'22P(表1, C-UKE-1として記載)と比較すると, 18, 21, 26, 27位のメチル基および22位( $\delta$  4.20 ppm)のプロトンシグナルは, ほぼ同じ化学シフトに観察されていることが分かった. したがって, C-UKE-6は, C-UKE-1と同様に, Eと同じ側鎖構造をもち, 22位がリン酸化されていることが示された. オキシメチン



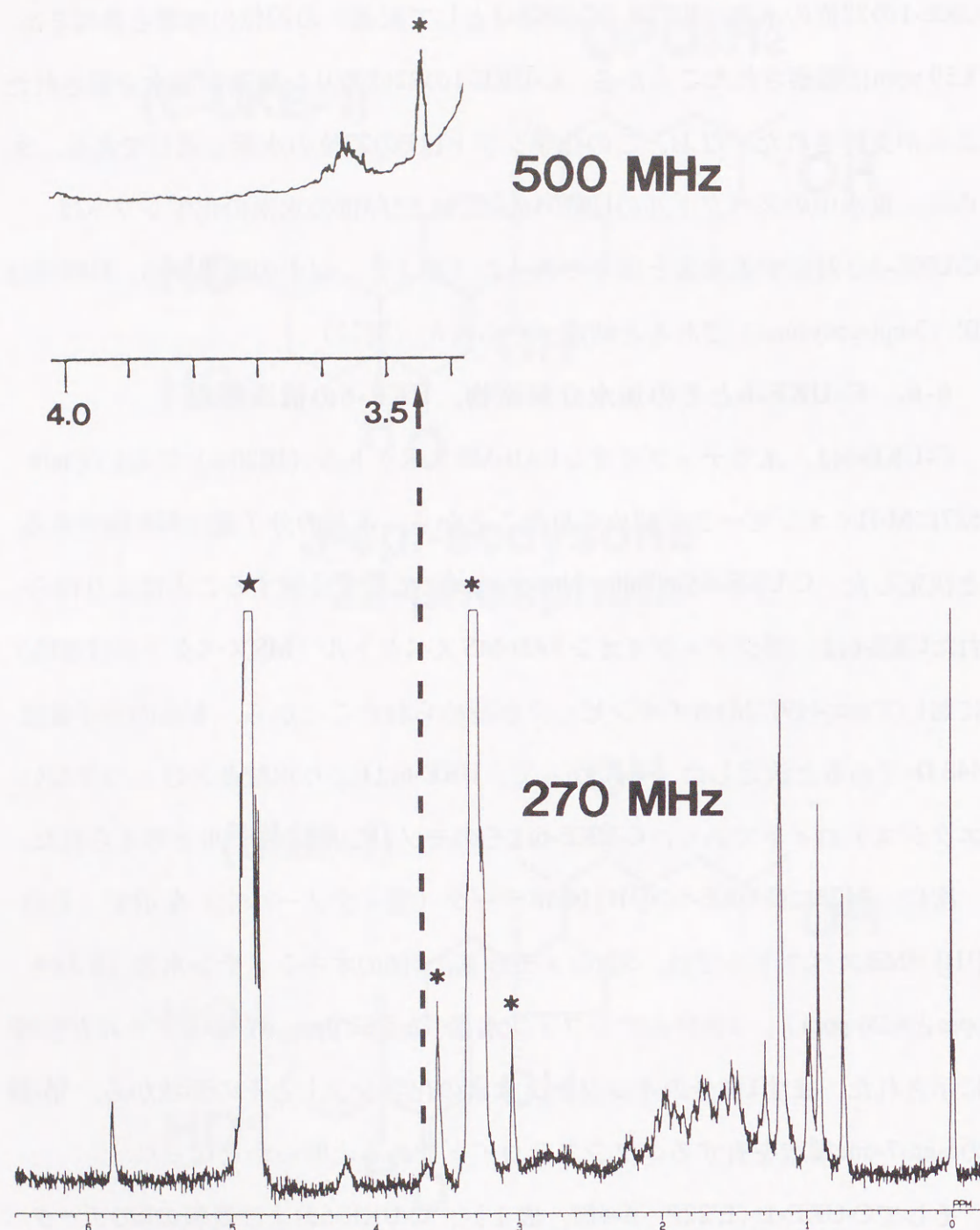


図 23 休眠卵から精製した抱合型エクジステロイド (C-UKE-6) の270 MHzと500 MHzの  $^1\text{H}$  NMRスペクトル  
溶媒には重メタノールを使用した. 基準物質にTMSを使用した.  
(\*)は溶媒に由来するシグナルを示している. (★)はサンプル内に混入している $\text{H}_2\text{O}$ シグナルを示している. 点線の矢印は, 270 MHzにて測定したスペクトル内のシグナルにおいて, より詳細な形状を明らかにするために, 500 MHzにて測定した拡大図を示している.

表 2 C-UKE-6 と UKE-6 の $^1\text{H}$  NMRデータ.

	18-H3	19-H3	21-H3	26-H3	27-H3	3-H $\beta$	7-H	9-H $\alpha$	22-H
C-UKE-6	CD <sub>3</sub> OD	0.746 (s)	0.914 (s)	0.983 (d,6.0)	1.173 (s)	1.186 (s)	(m,w1/2=21) (d,2.2)	unclear (m,w1/2=22)	4.20
	D <sub>2</sub> O	0.737 (s)	0.914 (s)	0.959 (d,6.6)	1.216 (s)	(m,w1/2=21) (m)	5.98 (m)	3.18 (m,w1/2=21)	4.16
UKE-6	CD <sub>3</sub> OD	0.726 (s)	0.915 (s)	0.944 (d,6.0)	1.186 (s)	1.194 (s)	(m,w1/2=22) (d,2.2)	3.18 (m)	3.59 (brd,10.5)

表内の数値の表記法と略号については, 表1と同様である.

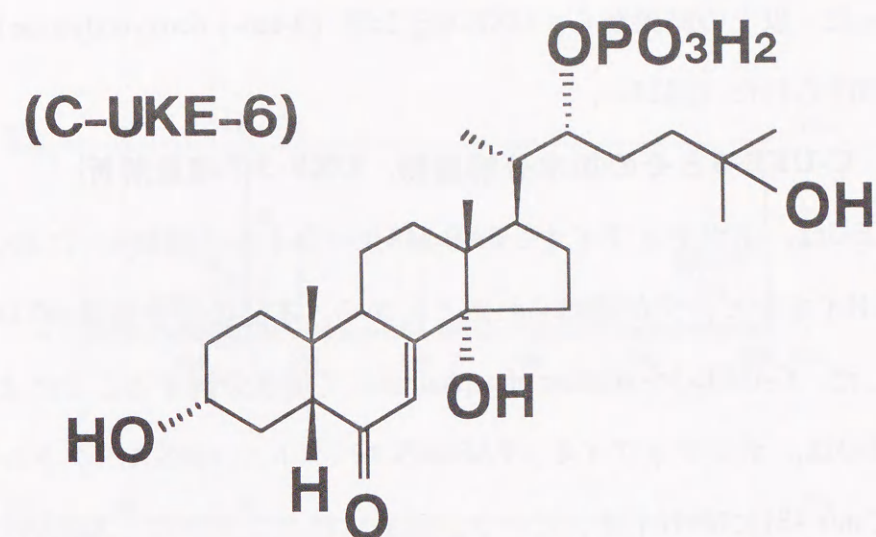


水素は22位の水素以外にただひとつ $\delta$  3.56 ppmに観察された。このプロトンの半値巾の値 (21 Hz) から上記シグナルはaxial水素と考えられた。以上より、C-UKE-6の骨格部の構造として、MSから明らかとなった水酸基の数も考慮にいれて、3-*epi*-2-deoxy- (3位がaxial水素を有する2-deoxy-3 $\alpha$ -hydroxy-構造) または3-deoxy- (2位がaxial水素を有する2 $\beta$ -hydroxy-3-deoxy-構造) 骨格の可能性が考えられる (2-*epi*-3-deoxy-骨格の場合は2位にequatorial水素を有する構造、また2-deoxy-骨格の場合は3位にequatorial水素を有する構造となるため、これらの可能性は除外される)。

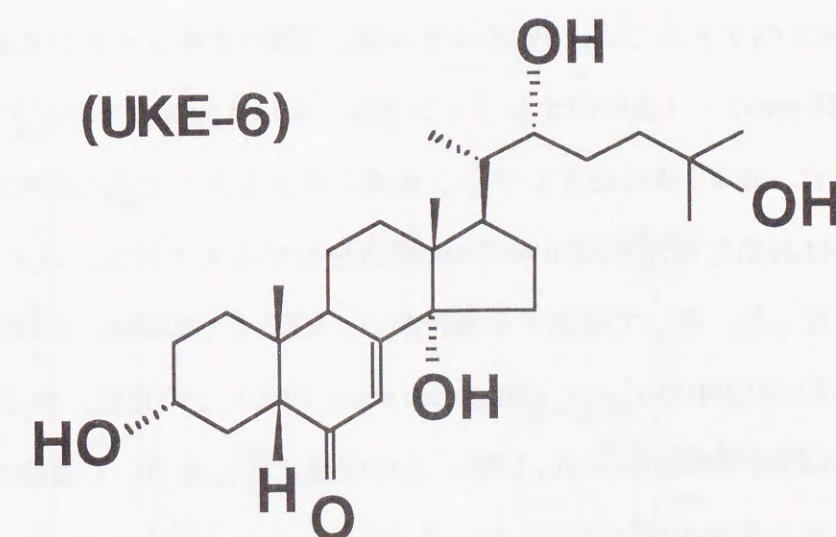
さらにA環部のNMRデータを注意深く検討することにより、19位のメチル基 ( $\delta$  0.914 ppm) の化学シフトが僅かではあるがEに比較して高磁場にシフトしていた ( $-0.052$  ppm)。この現象は既に報告されている3-*epi*-2-deoxy-骨格をもつエクジステロイドである、2dE'3Pのデータ (Isaac and Rees, 1984) に特徴的に見られるものである。さらに、C-UKE-6の重水中のスペクトル (表2) で9 $\alpha$ 位の水素 ( $\delta$  3.18 ppm) がE ( $\delta$  3.07 ppm) より低磁場にシフトしていることが示された。このことは、2-deoxy-3-*epi*-骨格とすると良く説明できるが、3-deoxy-骨格では説明出来ない。

以上のことから、C-UKE-6は2dE'22P (3-*epi*-2-deoxyecdysone 22-phosphate) と結論づけられた (図24)。なお、C-UKE-6のNMRデータは特に3位および22位の水素の化学シフトに関して既知の2dE'3Pのデータとは明らかに異なっており、C-UKE-6が3位のphosphateの可能性は否定された。

次に、UKE-6は2dE'22Pと $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中、表2) を直接比較した。両者のNMRスペクトルは前述の22d20Eと22d20E3Pとの比較 (6-3節) や前節のE'とE'22Pとの比較と同様に、ほとんどのシグナルの化学シフトと形状の一致が確認され、またUKE-6のNMRデータにおいて、22位の水素はE'と同じく3.59 ppmに観察され、22位のphosphateが加水分解されたことが支持された。また、3位の水素の化学シフトはC-UKE-6 (2dE'22P) の対応する水素と同



**3-*epi*-2-deoxy-  
ecdysone 22-phosphate**



**3-*epi*-2-deoxyecdysone**

図 24 カイコの卵エクジステロイドとして決定された抱合型エクジステロイドと同定された遊離型エクジステロイドの構造



じであった。以上の結果から、UKE-6は 2dE' (3-*epi*-2-deoxyecdysone) であると結論づけられた (図24)。

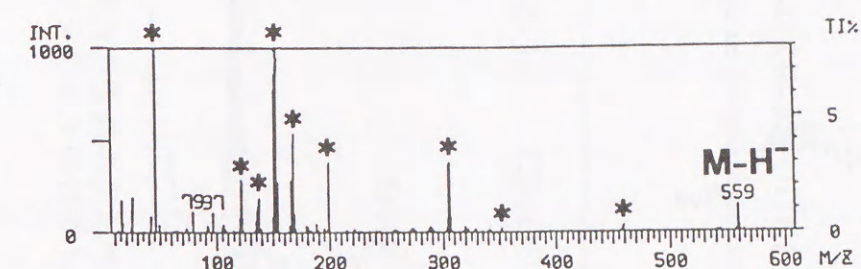
### 6-7. C-UKE-3とその加水分解産物、UKE-3の構造解析

C-UKE-3は、ネガティブイオンFAB-MSスペクトル (図25-a) において  $m/z$  559にM-Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は560 Daであると決定した。C-UKE-3をalkaline phosphataseにて加水分解することにより得られたUKE-3は、ポジティブイオンFAB-MSスペクトル (MSスペクトルは省略) において  $m/z$  481にM+Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は480 Daであると決定した。したがって、UKE-3は20Eとその分子量が一致することから、20Eと等しい数の水酸基を有するエクジステロイドであり、C-UKE-3はそのモノリン酸エステルと考えられた。

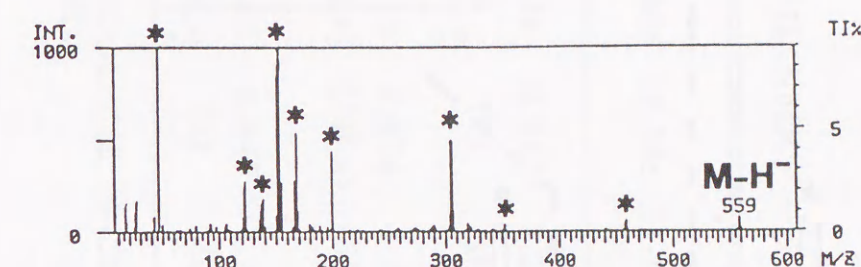
次に、図26にC-UKE-3の $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中) を示す。その $^1\text{H}$  NMRスペクトルでは、4個のメチル基、2個のオキシメチン水素 ( $\delta$  3.54 ppmと4.22 ppm)、1個分のオレフィン水素 ( $\delta$  5.80 ppm, d) のシグナルが明瞭に示された。まず1個分のオレフィン水素の化学シフトとその形状から、C-UKE-3は典型的な5 $\beta$ -型の6-en-7-one構造を有するエクジステロイドであると明らかとなった。そして後述する解析から、UKE-1 (22d20E, 6-2節内に記載) と既報の22d20,26Eのデータ (Bückman et al., 1986) との比較、さらに既報の標品22d20E'2P (Mamiya et al., 1995) との直接比較に基づいて最終的に各メチル基とメチン水素の帰属を行った (表3)。

まず、C-UKE-3のNMRデータ (重メタノール中、表3) を20E, 22d20Eおよび2,22d20Eと比較すると、C-UKE-3の4個のメチル基のうち3個のメチル基の水素のシグナルは22d20Eとほぼ同じ化学シフトでさらに同じ形状に観察された。このことから18, 19, 21位のメチル基が容易に帰属された。このうち、18位と21位のメチル基から6-2節に示したようにC-UKE-3の20位に水酸基を有することが明らかとなった。また、21位のメチル基の値は、22d20Eと2,22d20Eと近

(a)



(b)



(c)

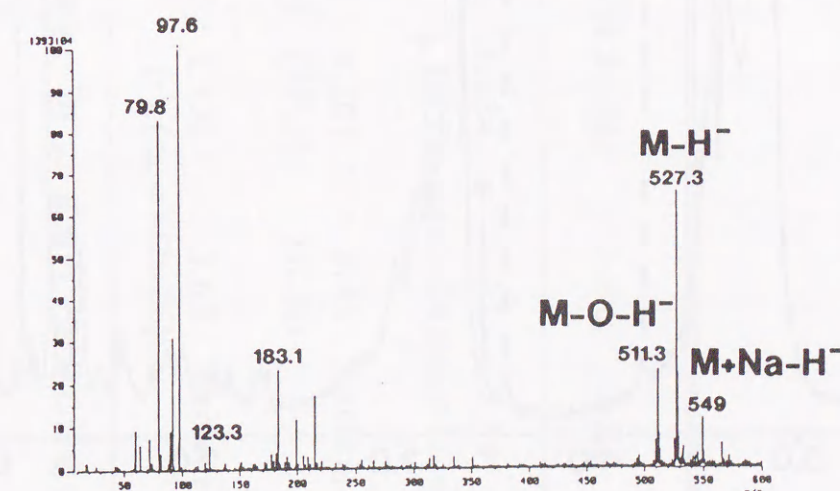


図25 抱合型エクジステロイド (C-UKE-3, C-UKE-2, C-UKE-7) のネガティブFAB-MSスペクトル  
マトリックスとして(a)と(b)はNBAを、(c)はグリセロールを使用した。(a)はC-UKE-3の、(b)はC-UKE-2の、(c)はC-UKE-7のMSスペクトルを示している。(\*)はマトリックス由来のピークを示している。測定領域は、0 ~ 1200  $m/z$ とし、図には0 ~ 600  $m/z$ を示した。



表 3 C-UKE-3 と UKE-3 の<sup>1</sup>H] NMRデータ.

		18-Me	19-Me	21-Me	26-CH <sub>2</sub> OH	27-Me	2-H $\alpha$	3-H $\beta$	7-H	9-H $\alpha$
C-UKE-3	CD <sub>3</sub> OD	0.844	0.947	1.269	3.437	1.134	4.22	3.54	5.81	unclear
	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(m,w1/2=34)	(m,w1/2=22)(d,2.4)			
	D <sub>2</sub> O	0.819	0.974	1.171	3.456	1.301	3.76	unclear	5.98	3.07
	(3H,s)	(3H,s)	(3H,s)	(3H,s)	(2H,s)	(3H,s)	(H,m)		(H,d,2.4)	(H,m)
UKE-3	CD <sub>3</sub> OD	0.847	0.945	1.270	3.357	1.132	3.63	unclear	5.81	3.17
	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(m,w1/2=26)		(d,2.4)		(m)

表内の数値の表記法と略号については、主に表 1 と同様である。但し、重水内で測定した場合は ( ) 内にプロトンシグナルの個数も付記した。

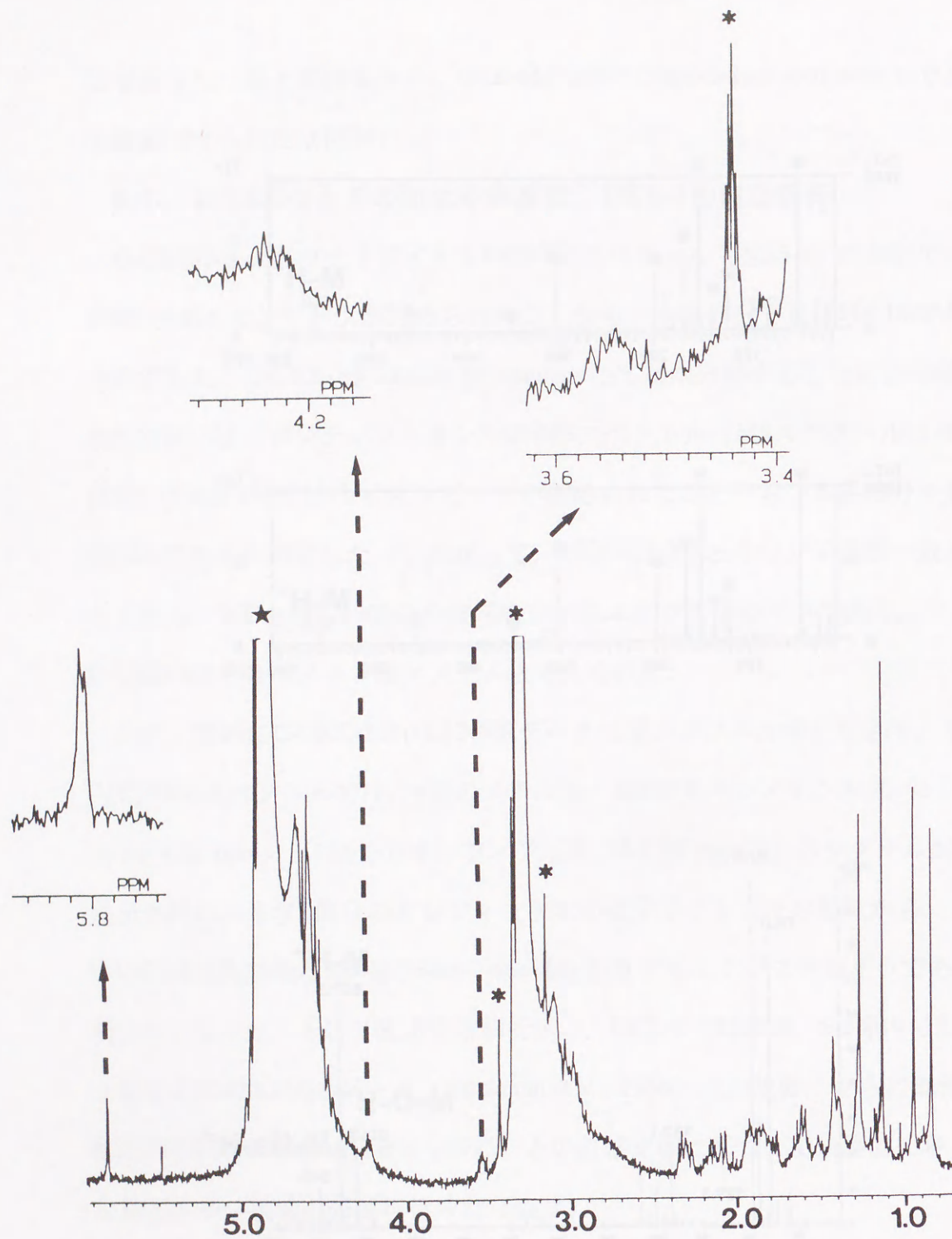


図 26 休眠卵から精製した抱合型エクジステロイドC-UKE-3) の270 MHz <sup>1</sup>H] NMRスペクトル  
溶媒には重メタノールを使用した。基準物質にTMSを使用した。  
(\*)は溶媒に由来するシグナルを示している。(★)はサンプル内に混入しているH<sub>2</sub>Oシグナルを示している。点線の矢印は、  
スペクトル内のシグナルにおいて、より詳細な形状を明らかにする  
ために、それぞれの拡大図を示している。



似し、20Eと相違することから、C-UKE-3の21位近傍の水素の環境が22d20Eと2,22d20Eに類似し、これらの化合物と同様に22位の水酸基を欠損することが明らかとなった。そして、残りの1個のメチル基を26位あるいは27位に相当すると考えた。

次に、2個のオキシメチン水素は $\delta$  3.54 ppmと $\delta$  4.22 ppmに観察され、半値巾の値 (22 Hzと34 Hz) から上記シグナルはaxial水素と考えられた。22位のオキシメチン水素が欠損していること、さらにオキシメチン水素の数から22位のリン酸基が結合する可能性が否定されることから、上記シグナルは2位あるいは3位の水素であり、そしていずれかにリン酸基が結合していることが考えられた。以上より、C-UKE-3の部分構造として、3-epi-22-deoxy-20-hydroxy-骨格の3-phosphateあるいはその2-phosphateの可能性が考えられた ([1] 22-deoxy-20-hydroxy-骨格の3-phosphateとその2-phosphateはいずれも2位がaxial水素、3位がequatorial水素となるため除外される, [2] 2-epi-22-deoxy-20-hydroxy-骨格の3-phosphateとその2-phosphateはいずれも2位がequatorial水素、3位がequatorial水素となるため除外される, [3] また、2,3-diepi-22-deoxy-20-hydroxy-骨格の3-phosphateとその2-phosphateはいずれも2位がequatorial水素、3位がaxial水素となるため除外される)。

現在までに明らかにされているエクジステロイドのうち、3-epi-22-deoxy-20-hydroxy-骨格の3-phosphateあるいはその2-phosphate構造を有する化合物は22d20E'2P (Mamiya et al., 1995) に限られる。そしてこの化合物の2位と3位の既報に記載のデータを比較してみると、それぞれC-UKE-3の $\delta$  4.22 ppmと $\delta$  3.54 ppmのシグナルとよく一致した。以上の結果と、MSデータから明らかとなる水酸基の数を考えあわせると、C-UKE-3は3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone 2-phosphateを部分構造とし、さらに、いずれかの部位にさらに水酸基が1つ結合している化合物であることが示された。この水酸基の結合部位は上述のように26, 27位に相当するメチル基が1個分しかないこと、オキシメチレン

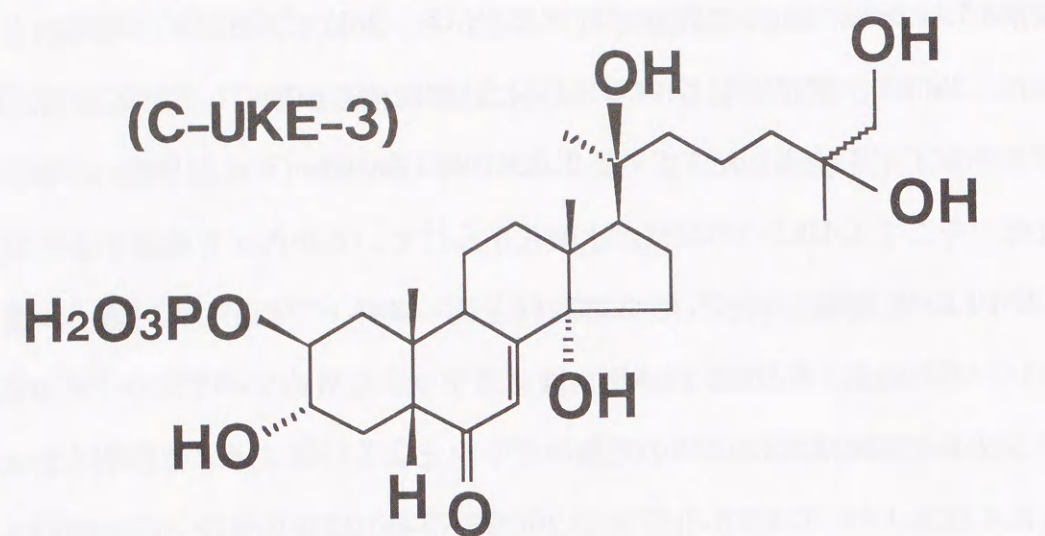
水素が $\delta$  3.44 ppmにsingletで観察されたことから、26位であることが明らかとなった。26位に水酸基をもち、C-UKE-3に比較的構造が類似している既知のエクジステロイドを検索したところ、22d20,26E (Bückman et al., 1986) が挙げられた。そこでC-UKE-3の26位が水酸化を受けているか否かを確認するために、C-UKE-3を既報に示された22d20,26Eと同一条件下で測定した (表3, 重水中)。その結果、C-UKE-3のA環に関するデータ以外のすべてのシグナルの化学シフトと形状は22d20,26Eの既報のデータとよく一致することが明らかとなった。以上より、C-UKE-3は22d20,26E'2P (3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone 2-phosphate) と結論づけられた (図27)。

次に、UKE-3は22d20,26E'2Pと $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中, 表3, 22d20,26E'2PはC-UKE-3として記載) を直接比較した。両者のNMRスペクトルは前述に示したリン酸型とその遊離型との比較 (6-3, 6-5および6-6節) と同様にほとんどのシグナルの化学シフトと形状の一致が確認され、またUKE-3のNMRデータにおいて、2位の水素はC-UKE-3の2位と異なる $\delta$  3.63 ppmに観察されたことから、2位のリン酸基が加水分解されたことが支持された。また、22d20E標品を同一条件下で測定したところ、2位の水素の化学シフトはUKE-3の対応する水素と同じであった。以上の結果から、UKE-3は22d20,26E' (3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone) であると結論づけられた (図27)。

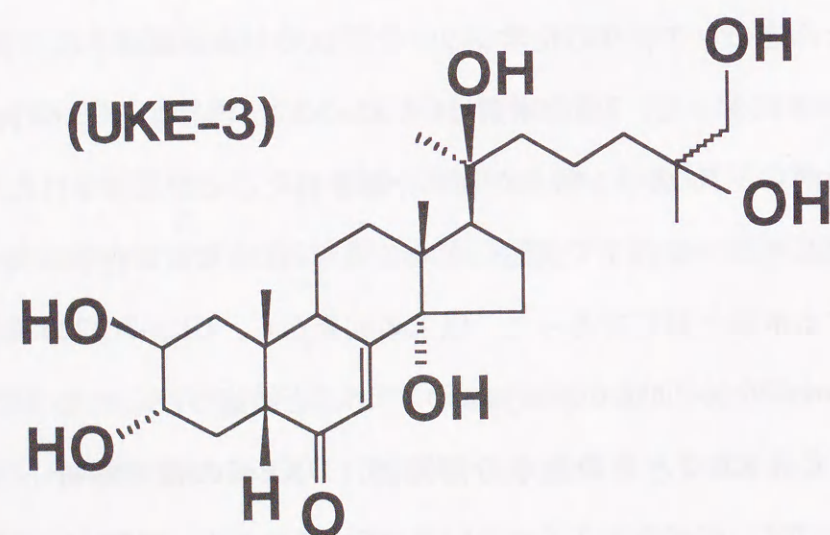
#### 6-8. C-UKE-2とその加水分解産物, UKE-2の構造解析

C-UKE-2は、ネガティブイオンFAB-MSスペクトル (図25-b) において $m/z$  559にM-Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は560 Daであると決定した。C-UKE-2をalkaline phosphataseにて加水分解することにより得られたUKE-2は、ポジティブイオンFAB-MSスペクトル (MSスペクトルは省略) において $m/z$  481にM+Hイオンピークが認められたことから、本品の分子量は480 Daであると決定した。これらの分子量は、それぞれC-UKE-3とUKE-3 (22d20,26E'2Pと22d20,26E') のデータに一致したことから、UKE-2は





**3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone 2-phosphate**



**3-epi-22-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone**

図 27 カイコの卵エクジステロイドとして決定された抱合型エクジステロイドと遊離型エクジステロイドの構造

22d20,26E'と同じ数の水酸基を有するエクジステロイドであり、C-UKE-2はそのモノリン酸エステルと考えられた。

次に、図28にC-UKE-2の $^1\text{H}$  NMRデータ（重メタノール中）を示す。その $^1\text{H}$  NMRスペクトルでは、5個のメチル基、2個のオキシメチン水素（ $\delta$  3.54 ppmと4.22 ppm）、1個分のオレフィン水素（ $\delta$  5.80 ppm, d）のシグナルが明瞭に示された。まず1個分のオレフィン水素の化学シフトとその形状から、C-UKE-2は典型的な5 $\beta$ -型の6-en-7-one構造を有するエクジステロイドであると明らかとなった。そして後述する解析から、UKE-1（22d20E, 6-2節内に記載）、C-UKE-3（22d20,26E'2P, 6-7節, 表3）および既報のMalacosterone（16( $\beta$ ),20-dihydroxyecdysone [16( $\beta$ ),20E]）のデータ（Garcia et al., 1986）との比較に基づいて最終的に各メチル基とメチン水素の帰属を行った（表4）。

まず、C-UKE-2のNMRデータ（重メタノール中、図28と表4）の5個のメチル基のうち3個のメチル基の水素のシグナルは22d20Eとほぼ同じ化学シフトでさらに同じ形状に観察された。このことから21, 26, 27位のメチル基が容易に帰属された。このうち、21位のメチル基のシグナルの形状から6-2節に示したようにC-UKE-2の20位に水酸基を有することが明らかとなった。また21位のメチル基の値は、22d20,26E'2Pとほぼ同じことから、この化合物と同様に22位の水酸基を欠損することが明らかとなった（6-7節参照）。そして、残りの2個のメチル基を18位と19位のいずれかに相当すると考えた。

次に、2個のオキシメチン水素は22d20,26E'2P（表3, C-UKE-3として記載）の2位と3位によく一致することから、それぞれを2位と3位に帰属した。以上の結果とさらに、MSデータがC-UKE-2と22d20,26E'2Pで一致することから、C-UKE-2は3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone 2-phosphateを部分構造とし、さらにいずれかの部位に水酸基が1つ結合している化合物であることが示された。

また、表4に明らかなように、その水酸基の結合により、側鎖とA環は影響されていないことが明らかである。しかし、18位あるいは19位に相当するメ



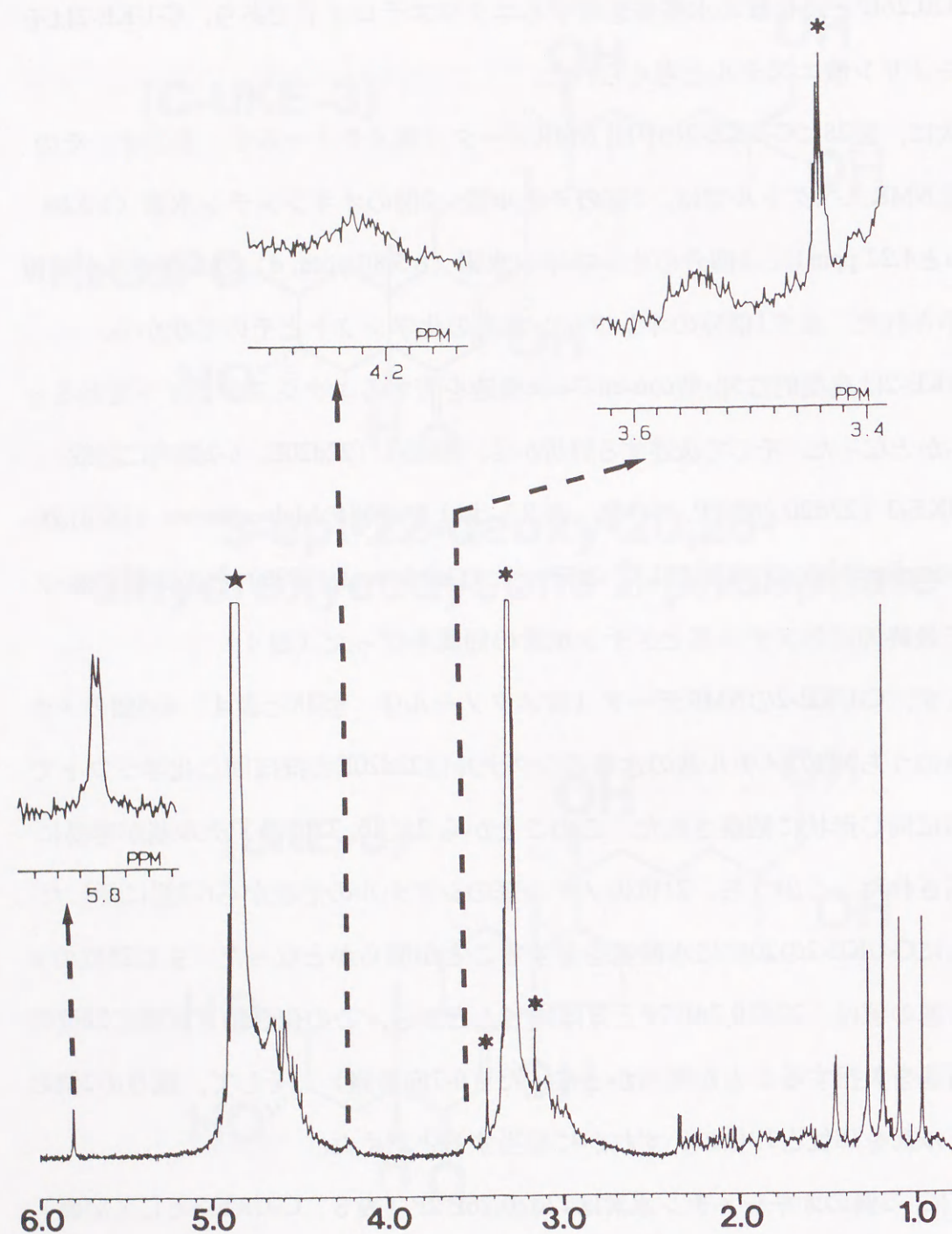


図 28 休眠卵から精製した抱合型エクジステロイド (C-UKE-2) の 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 溶媒には重メタノールを使用した。基準物質に TMS を使用した。  
 (★) は溶媒に由来するシグナルを示している。(★) はサンプル内に混入している  $\text{H}_2\text{O}$  シグナルを示している。点線の矢印は、スペクトル内のシグナルにおいて、より詳細な形状を明らかにするために、それぞれの拡大図を示している。

表 4 C-UKE-2 と UKE-2 の  $^1\text{H}$  NMR データ.

	18-H <sub>3</sub>	19-H <sub>3</sub>	21-H <sub>3</sub>	26-H <sub>3</sub>	27-H <sub>3</sub>	2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub>	7-H	9-H <sub>α</sub>
C-UKE-2	CD <sub>3</sub> OD	1.096 (s)	0.969 (s)	1.274 (s)	1.188 (s)	1.188 (s)	(m, w1/2=34)	(m, w1/2=22)	(d, 2.4)
	D <sub>2</sub> O	1.108 (s)	0.998 (s)	1.334 (s)	1.228 (s)	1.228 (s)	3.75 (m)	unclear	5.98 (m)
UKE-2	CD <sub>3</sub> OD	1.101 (s)	0.966 (s)	1.274 (s)	1.186 (s)	1.186 (s)	3.63 (m, w1/2=26)	unclear	5.81 (d, 2.4)
								3.17 (m)	

表内の数値の表記法と略号については、表 1 と同様である。



チル基は、一方が僅かに低磁場にシフトし、他方が非常に低磁場に示されたことから、その水酸基は、ステロイド骨格のC環上あるいはD環上のβ位に結合している2級または3級の水酸基であると考えられた。つまり3級の水素である14β位と17β位、2級の水素である11β位、12β位、15β位および16β位である。

しかし、14位には既にα位に水酸基が結合していることから、14β位の可能性は否定された。そこで、これら11β位、12β位、15β位、16β位および17β位のいずれかに水酸基を有する既知のエクジステロイドを検索した結果、16β-OH化合物としてMalacosterone (16(β),20E) が挙げられた (Garcia et al., 1986)。この既報では、一次元の<sup>1</sup>H NMRに加え、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H シフト相関二次元NMR (H-H 2D COSY) と二重共鳴法 (スピンドカップリング法) による実験から、15α-H, 15β-Hおよび17α-Hを帰属し、これら3つの各々の水素と16α-Hとのカップリングが示され、最終的に16β位に存在する水酸基の証明がなされた。そして同時にC環上の水酸基、15β位および17β位の水酸基の可能性を否定していた。

そこで、C-UKE-2についても、16位の水酸基が存在するか否かを明らかにするために、まずC-UKE-2をalkaline phosphataseにて加水分解し、UKE-2とした後にMalacosterone (16(β),20E) と同様の実験をおこなった。

まず、UKE-2はC-UKE-2と<sup>1</sup>H NMRデータ (重メタノール中、表4) を直接比較した。両者のNMRスペクトルは前節に示した22d20,26E'2Pと22d20,26E'の比較と同様に、ほとんどのシグナルの化学シフトと形状の一致が確認され、またUKE-2のNMRデータにおいて、2位の水素はC-UKE-2の2位と異なるδ 3.63 ppmに観察されたことから、2位のリン酸基が加水分解されたことが支持された。この2位の水素の化学シフトはUKE-3の対応する水素と同じであった。以上の結果から、UKE-2は22d20E'を骨格とし、さらに11β位、12β位、15β位、16β位および17β位のいずれかに水酸化を受けた化合物であると推定された。

まず、既報においてMalacosterone (16(β),20E) の16α位のオキシメチンプロトンのシグナルは、20℃の測定時にδ 4.80 ppmのDHOシグナルに埋没している

ため解析しえなかったが、80℃の測定時においてδ 4.73 ppm (m, w1/2=22 Hz) に示され、そしてこのシグナル付近を照射することにより、δ 2.36 ppm (7.9 Hz, 17α-H), δ 2.34 ppm (7.8 Hz, 15α-H) およびδ 2.14 ppm (5.5 Hz, 15β-H) の3つのシグナルの形状が単純化されたと報告されている。このことから、UKE-2についても同様に16β位に水酸基があると仮定し、δ 4.73 ppm付近 (δ 4.60 ppm, δ 4.70 ppm, δ 4.80 ppm, δ 4.85 ppm) を二重共鳴法で照射した (図29)。その結果、δ 4.80 ppmを照射した場合にMalacosterone (16(β),20E) と同様にδ 2.10~2.40 ppm付近のシグナルの形状に最も明瞭な変化が観察された (δ 4.60 ppm, δ 4.70 ppmおよびδ 4.85 ppmのNMRスペクトルは省略)。

この領域には5つ分の水素に相当するシグナルがδ 2.10 ppm, δ 2.13 ppm, δ 2.23 ppm, δ 2.28 ppmおよびδ 2.33 ppmに確認されるが、δ 2.13 ppm (d,d, 14.0, 5 Hz) のシグナルとδ 2.23 ppm (d,d, 12.6, 5 Hz) のシグナルは比較として用いた22d20E'のスペクトル (重水中、WEFTモードで測定、図29) とよく一致したことから、5-Hと1-Hに容易に帰属された。そして残りの3つのシグナルのうち、δ 2.33 ppm (d,d, 14.0, 7.9 Hz) のシグナルとδ 2.10 ppm (d,d, 14.0, 5.6 Hz) のシグナルは、Malacosterone (16(β),20E) のデータと殆ど一致したことから、15α-Hと15β-Hに容易に帰属された。16β位に水酸基を有すると仮定した場合、UKE-2の15位と16位の環境は、Malacosterone (16(β),20E) の対応する環境と等しくなることから、このように15α-Hと15β-Hのケミカルシフトとそれぞれの形状の両者間での一致は、推定構造の妥当性を示唆する。

最後にδ 2.28 ppm (d, 9.8 Hz) のシグナルは、Malacosterone (16(β),20E) の17α-Hシグナルと同じ形状であったが、その化学シフトは約0.08 ppm 高磁場に示された。同様に16β位に水酸基を有すると仮定した場合、UKE-2と16,20Eは側鎖の環境が異なる (UKE-2は22位の水酸基を欠損する) ため、UKE-2の17α-Hのケミカルシフトとが16,20Eの対応する水素のシフトと異なることが推定される。この推定と上述の結果に矛盾点が無いことから、UKE-2の17α-Hシ



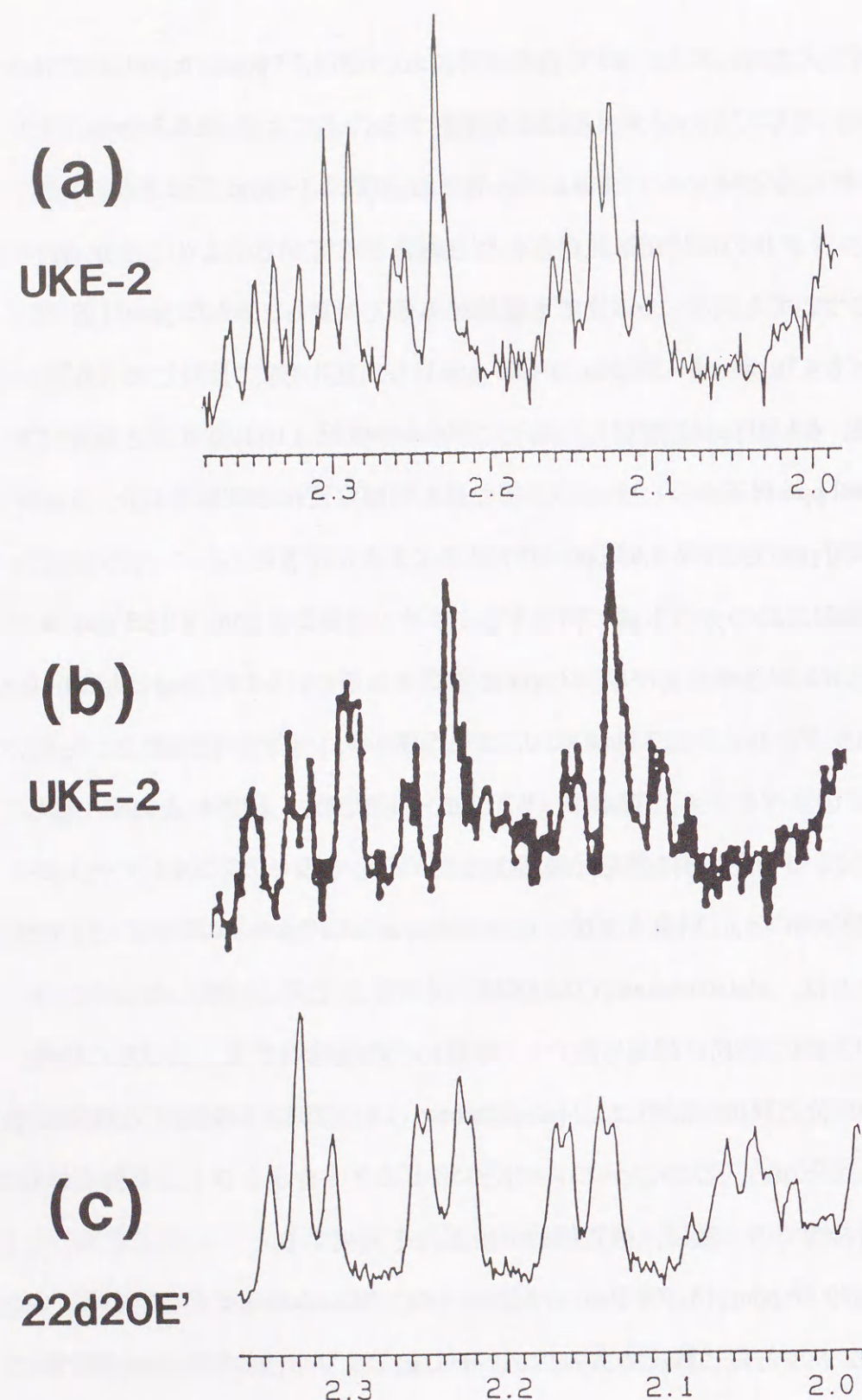


図 29 遊離型エクジステロイド (UKE-2) と 22d20E' の 500 MHz の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 溶媒には重水を使用した。測定は WEFT モードにて行った。4.77 ppm を DHO シグナルとした。(a) は UKE-2 のノーマルスペクトルを、(b) は 4.80 ppm を二重共鳴法にて照射したスペクトルを、(c) は比較のために、22d20E' のノーマルスペクトル示している。

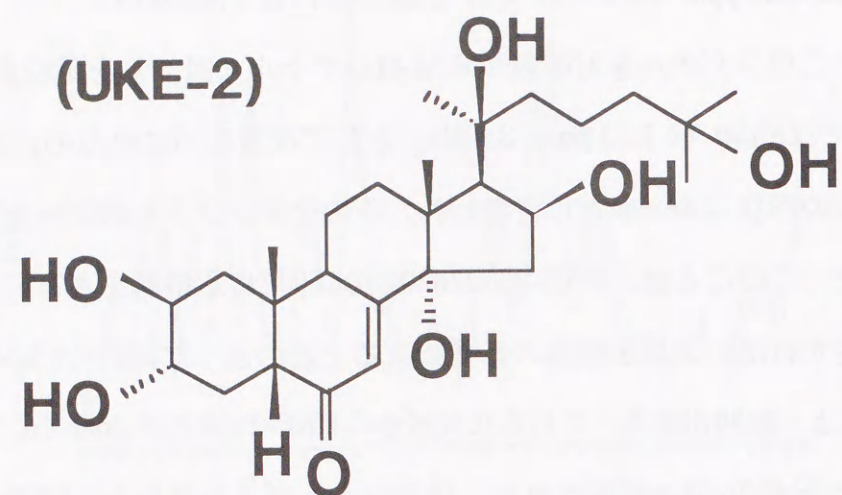
グナルは  $\delta$  2.28 ppm (d,  $J=9.8$  Hz) が適当であると思われる。

また、このシグナルを 22d20E' の  $17\alpha$ -H シグナル (図 29) と比較すると、22d20E' では triplet ( $\delta$  2.33 ppm, 8.9 Hz) として明瞭に示されるのに対し、このシグナルの形状は doublet として現われ、その化学シフトも約 0.04 ppm 高磁場に示された。このことは、UKE-2 が 22d20E' の  $16\beta$  位に水酸基をさらに有する化合物と仮定すれば、この水酸基の影響による上述のような両者の  $17\alpha$ -H シグナルの違いはよく説明出来る。これらの比較から UKE-2 の  $\delta$  2.28 ppm (d,  $J=9.8$  Hz) のシグナルは  $17\alpha$ -H と帰属された。以上のカップリングから、UKE-2 は  $16\beta$  位の水酸基を有する化合物であることが明らかとなり、16 位以外の C 環あるいは D 環上のすべての位置において水酸基を有する可能性が否定された。

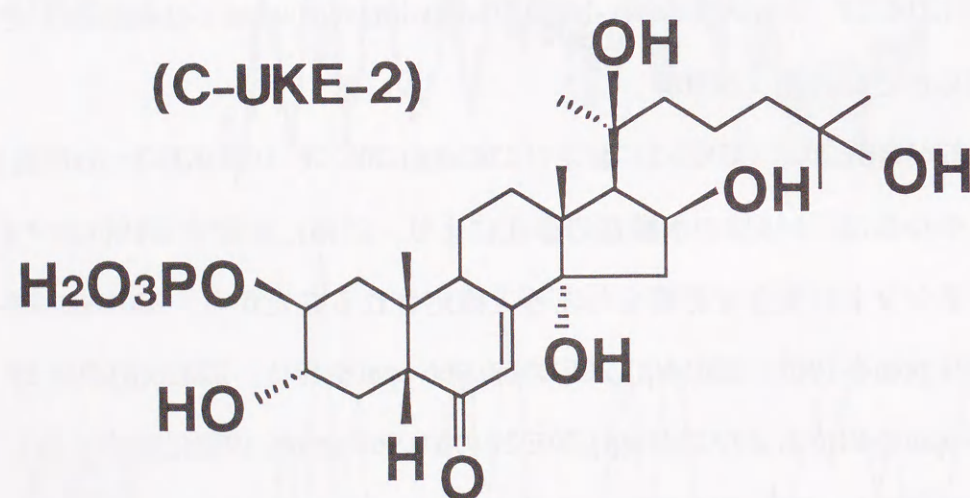
以上の結果、最終的に UKE-2 は 22d16( $\beta$ ), 20E' (3-epi-22-deoxy-16( $\beta$ ), 20-dihydroxyecdysone) と結論づけられた (図 30)。そしてこのことから、C-UKE-2 は 22d16( $\beta$ ), 20E' 2P (3-epi-22-deoxy-16( $\beta$ ), 20-dihydroxyecdysone 2-phosphate) であると明らかとなった (図 30)。

また、22d16( $\beta$ ), 20E' (UKE-2) および 22d16( $\beta$ ), 20E' 2P (C-UKE-2) の 18 位と 19 位のメチル基は、 $16\beta$  位の水酸基の存在により、近傍に位置する 18 位のメチル基の化学シフトに大きな影響を与えると推定されることから、22d16( $\beta$ ), 20E' の  $\delta$  1.101 ppm を 18 位、22d16( $\beta$ ), 20E' の  $\delta$  0.966 ppm を 19 位、22d16( $\beta$ ), 20E' 2P の  $\delta$  1.096 ppm を 18 位および 22d16( $\beta$ ), 20E' 2P の  $\delta$  0.969 ppm を 19 位に相当すると考えた。この場合、22d16( $\beta$ ), 20E' の 19 位の化学シフトの値 ( $\delta$  0.966 ppm) は、前述の 22d20, 26E' と 22d20E' の 19 位の化学シフトの値 ( $\delta$  0.945 ppm [表 3] と  $\delta$  0.950 ppm) と近似することとなり、これらに構造上の矛盾点は見られなかった。さらに、既報において Malacosterone (16( $\beta$ ), 20E) と 20E の NMR データ (重水中) の比較から、 $16\beta$  位の水酸基の存在により 18 位のメチル基は非常に大きく低磁場にシフト (約 0.24 ppm) し、19 位のメチル基は僅かに低磁場にシフト (約 0.02 ppm) することが示されている。以上のことから、最終的に





**3-epi-22-deoxy-16(β),20-dihydroxyecdysone**



**3-epi-22-deoxy-16(β),20-dihydroxyecdysone 2-phosphate**

図 30 カイコの卵エクジステロイドとして決定された遊離型エクジステロイドと抱合型エクジステロイドの構造

22d16(β),20E' と 22d16(β),20E'2P の 18 位と 19 位のメチル基を上述のように帰属した (表 4)。

## 6-9. UKE-7 の構造解析

### 6-9-1. MS と NMR スペクトルによる UKE-7 の構造解析

UKE-7 は、ポジティブイオン FAB-MS スペクトル (MS スペクトルは省略) において  $m/z$  449 に  $M+H$  イオンピークが認められたことから、本品の分子量は 448 Da であると決定した。したがって、UKE-7 はカイコ卵巣内の既知の 2,22d20E (Ikekawa et al., 1980) とその分子量が一致することから、2,22d20E と等しい数の水酸基を有するエクジステロイドであると考えられた。

次に、図 31 に UKE-3 の  $[^1H]$  NMR データ (重メタノール中) を示す。その  $[^1H]$  NMR スペクトルでは、5 個のメチル基、2 個のオキシメチン水素 ( $\delta$  3.91 ppm と 4.03 ppm, 互いの化学シフトが近接しているために重なりが生じている, 拡大図参照), 1 個分のオレフィン水素 ( $\delta$  5.80, d) のシグナルが示された。

この、1 個分のオレフィン水素の化学シフトとその形状から、UKE-7 は典型的な 5β-型の 6-en-7-one 構造を有するエクジステロイドであると明らかとなった。そして後述する解析から、カイコ卵巣内の既知のエクジステロイドの 2dE, 既報に基づき合成した 5 種の標品 (2dE-2,22-diacetate, 23(R),25C, 23(S),25C, 23(R),25C-3,23-diacetate [23(R),25C3,23Ac], 23(S), 25C-3,23-diacetate [23(S),25C3,23Ac]) との直接比較に基づいて最終的に各メチル基とメチン水素の帰属を行った (表 5 と 6)。

まず、UKE-7 の NMR データ (重メタノール中, 表 5) を 2dE (2dE のデータは既報 [Lafont and Wilson, 1992] と殆ど一致することから、表 5 において省略した) と比較すると、UKE-7 の 5 個のメチル基のうち 2 個のメチル基の水素のシグナルは 2dE とほぼ同じ化学シフトでさらに同じ形状に観察された。このことから 18 位と 19 位のメチル基が容易に帰属された。また 1 個のメチル基は 2dE の 21 位のメチル基より、低磁場に示されたが、その形状が同様に doublet であるこ



表 5 UKE-7, 23(R),25-dihydroxycholesterol [23(R),25C], 23(S),25-dihydroxycholesterol [23(S),25C]  
およびC-UKE-7の  $^1\text{H}$  NMRデータ (CD<sub>3</sub>OD) .

	18-H <sub>3</sub>	19-H <sub>3</sub>	21-H <sub>3</sub>	26-H <sub>3</sub>	27-H <sub>3</sub>	3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub>	6-H	7-H	23-H	5-H <sub>β</sub>
UKE-7	0.719 (s)	0.959 (s)	0.993 (d)	1.276 (s)	1.236 (s)	3.91 (m,w1/2=9)	—	—	5.80 (d,2.0)	4.03 (m,w1/2=21)	2.43 (d,d)
23(R),25C	0.752 (s)	1.024 (s)	0.992 (d)	1.266 (s)	1.220 (s)	—	3.40 (m)	5.33 (m)	—	4.04 (m,w1/2=21)	—
23(S),25C	0.733 (s)	1.024 (s)	0.992 (d)	1.266 (s)	1.230 (s)	—	3.41 (m)	5.33 (m)	—	4.04 (m,w1/2=21)	—
C-UKE-7	0.722 (s)	0.936 (s)	0.996 (d)	1.275 (s)	1.236 (s)	4.49 (m,w1/2=16)	—	—	5.79 (d,2.0)	4.03 (m,w1/2=26)	2.49 (d,d)

表内の数値の表記法と略号については、表1と同様である.

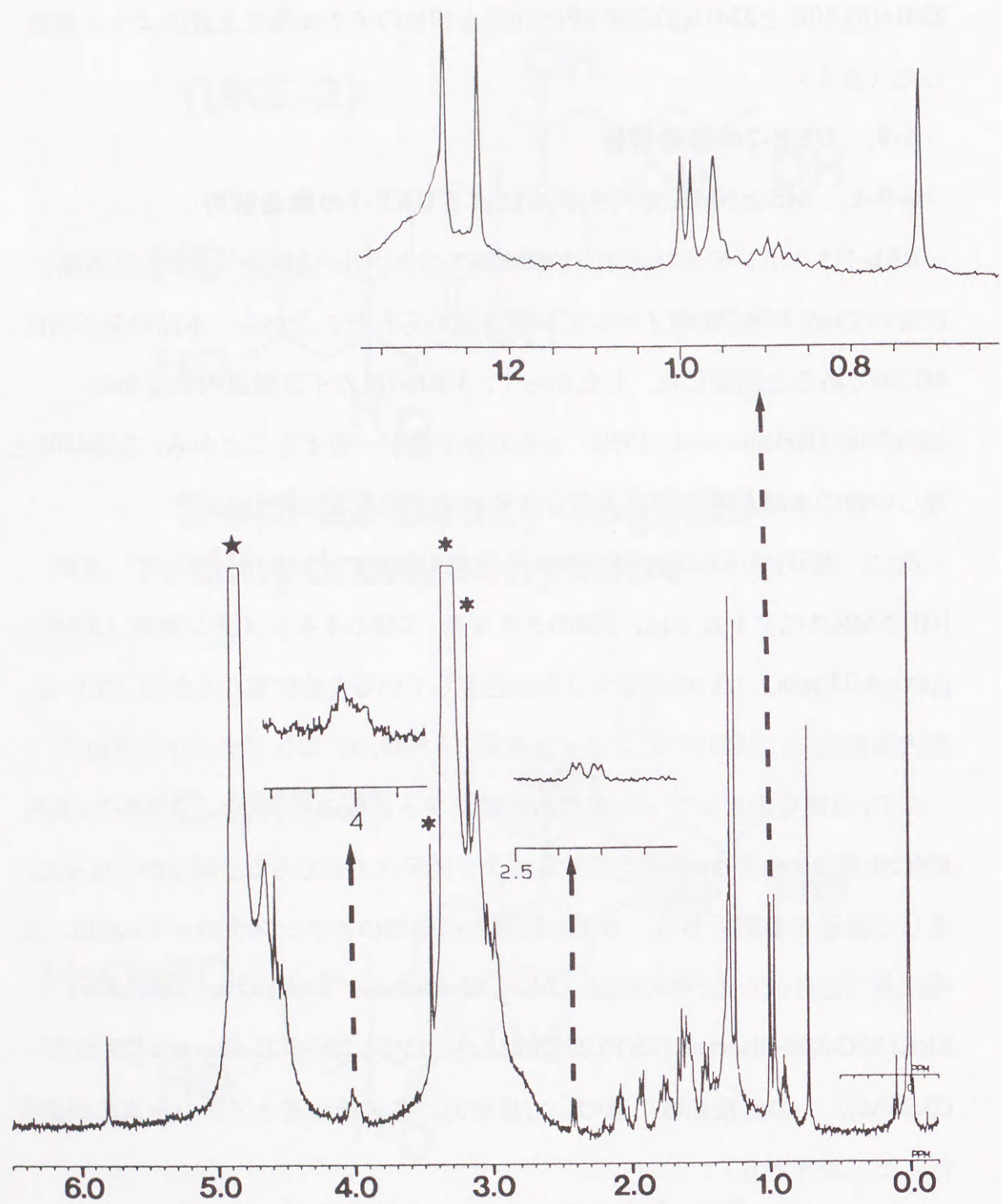


図 31 成熟卵巣と休眠卵から精製した遊離型エクジステロイド (UKE-7) の270 MHz  $^1\text{H}$  NMRスペクトル  
溶媒には重メタノールを使用した. 基準物質にTMSを使用した.  
(\*)は溶媒に由来するシグナルを示している. (★)はサンプル内に混入しているH<sub>2</sub>Oシグナルを示している. 点線の矢印は、スペクトル内のシグナルにおいて、より詳細な形状を明らかにするために、それぞれの拡大図を示している.



とから、21位のメチル基に帰属した。そして残りの2個のメチル基を26位と27位のメチル基に帰属した。

このうち、18位と21位のメチル基から6-2節に示したように（18位の化学シフトが2dEやEと同様に20Eの値より遥に高磁場であり、21位の形状がdoubletである）UKE-7は2dEと同様に、20位に水酸基を欠損することが明らかとなった。また、21位のメチル基の値は、2dEと比らべてやや低磁場に示されたことから、UKE-7の21位近傍の水素の環境が2dEと少し異なることが考えられた。しかし、20位は前述のようにどちらも等しいことから、22位の欠損の可能性が考えられた。実際、UKE-7の2個のオキシメチン水素のシグナルは、どちらも2dEの22位のオキシメチン水素のシグナルと一致しないことから、UKE-7の22位は水酸基を欠損していることが示された。

次に、UKE-7の2個のオキシメチン水素のシグナルは、 $\delta$  3.91 ppmと $\delta$  4.03 ppmに観察され、半値巾の値（9 Hzと21 Hz）から上記シグナルは順にequatorial水素とaxial水素と考えられた。この2個をいずれもA環の2位あるいは3位の2箇所の水酸基と考えた場合、UKE-7のスペクトルで得られた26位と27位のメチル基の既知のエクジステロイドでは前例のないような、非常に低磁場の化学シフトを説明することが出来ない。このためUKE-7は2,3-dihydroxy-構造の可能性は否定された。

次に、この2個のオキシメチン水素のうち、1個がA環の2位あるいは3位のいずれかの水酸基と考えた場合、もう片方のオキシメチン水素はMSデータから導かれる水酸基の数を考慮すると、側鎖の23位か24位のいずれかに結合（25位は既に水酸基を有しているため除外され、26位と27位の片方に水酸基が結合すると22d20,26E'の例のように片側のメチル基のシグナルが非常に低磁場に示されるはずであるが、UKE-7の26位と27位のシグナルでは説明出来ないために除外される）していることとなる。

次に、23位か24位のいずれかの水酸基と考えた場合、残りのA環上に結合し

表 6 UKE-7-3,23-diacetate(UKE-7-3,23Ac), 23(R),25C-3,23-diacetate [23(R),25C3,23Ac], 23(S),25C-3,23-diacetate [23(S),25C3,23Ac]および2dE-3,22-diacetate (2dE3,22Ac)の<sup>1</sup>H] NMRデータ (CDCl<sub>3</sub>) .

	18-H3	19-H3	21-H3	26-H3	27-H3	3-H $\alpha$	3-H $\beta$	6-H	7-H	9-H $\alpha$	22-H	23-H	5-H $\beta$	OAc
UKE-7-3,23Ac	0.689 (s)	0.991 (s)	1.025 (d,6.5)	1.231 (s)	1.248 (s)	5.08 (w1/2=8)	—	5.86 (d,2.5)	3.09	—	5.17 (m,w1/2=22)	2.38 (d,d)2.06[3H]	—	—
23(R),25C-3,23Ac	0.671 (s)	1.017 (s)	0.968 (d,7.2)	1.216 (s)	1.233 (s)	—	4.60 (w1/2=22)	5.37 (d,4)	—	—	5.22 (m,w1/2=18)	—	2.03[3H]	—
23(S),25C-3,23Ac	0.685 (s)	1.019 (s)	1.006 (d,5.0)	1.224 (s)	1.238 (s)	—	4.60 (w1/2=22)	5.37 (d,4)	—	—	5.14 (m,w1/2=19)	—	2.06 [6H]	—
2dE-3,22Ac	0.681 (s)	0.989 (s)	0.950 (d,6.5)	1.233 (s)	1.244 (s)	5.09 (w1/2=9)	—	5.86 (d,2.0)	3.10 (m,w1/2=22)	4.99 (m,w1/2=21)	2.36 (d,d)	2.03 [6H]	—	—

表内の数値の表記法と略号については、表 1 と同様である。



ているオキシメチン水素がequatorial水素と考えられる。この場合A環の構造は、2-deoxy-骨格 (2-deoxy-3 $\beta$ -hydroxy-構造) あるいは2-epi-3-deoxy-骨格 (3-deoxy-2 $\alpha$ -hydroxy-構造) の可能性が考えられる (3-deoxy-骨格, 3-epi-2-deoxy-骨格はともにaxial水素のため除外される)。以上のことから, UKE-7は2,22-dideoxyecdysone-骨格あるいは2-epi-3,22-dideoxyecdysone-骨格であり, 23位あるいは24位に水酸基を有する化合物であると推定された。

## 6-9-2. アセチル化によるUKE-7の構造解析

### 1) ステロイドのアセチル化

多くのエクジステロイドは, pyridineと無水酢酸にて, 常温で比較的容易にアセチル化することが可能であり, また, この反応時間を変化させることにより, 様々な種類のアセテートを派生することが明らかである (Takemoto et al., 1967a,b)。そして, これらのNMRデータより構造上の多くの情報が得られることから, エクジステロイドのアセチル化は, 一般に構造解析のためによく用いられる手法である (Horn and Bergamasco, 1985)。

そこで, エクジステロイドの前節の構造解析により推定した構造の確認と, 特にUKE-7のA環の構造を明らかにするため, 以下に示すように2dEとUKE-7を同一条件下でアセチル化を行い, 続いて両者の<sup>1</sup>H NMRデータ (重クロロホルム中, 表6) を直接比較し, さらなるUKE-7の帰属を試みた。ステロイドのアセチル化は既報 (Galbraith and Horn, 1969) の方法に従って行った。

### 2) 2dEのアセチル化

2dE (900  $\mu$ g) をpyridine (50  $\mu$ g) に溶かし, 無水酢酸 (100  $\mu$ g) を加えて室温で一夜放置した後, TLCにて精製 (溶媒4) し, 2dEのアセテート (Rf 0.441) を得た。さらに, 分析用のRP-HPLC (システム14) に付し, 6.5 分に溶出する2dEのアセテートを得た。

これまで報告されている非常に多くのエクジステロイドアセテートのデータから, アセチル基由来のメチルシグナルは約 $\delta$  2.00 ppm近傍に示されること

が明らかである (Rudel et al., 1992参照)。またアセチル化された位置のオキシメチン水素は, もとの化合物と比較して非常に低磁場にシフトすることも明らかである (Rudel et al., 1992参照)。2dEアセテートの<sup>1</sup>H-NMRデータ (重クロロホルム中, 表6) では, ほとんどのシグナルはEとよく一致した。しかし, Eの3位と22位のオキシメチン水素に相当する ( $\delta$  4.03 ppm,  $\delta$  3.65 ppm) オキシメチン水素は低磁場の $\delta$  5.09 ppmと $\delta$  4.99 ppmにシフトした。そして,  $\delta$  2.03 ppmに2個分のメチルに相当するアセチル基由来のピークを確認した (さらに, 2dEと2dEアセテートは重メタノール中 [NMRスペクトルデータは省略] で比較し同様の結果を得た)。以上のことから, 表6のように帰属し, この化合物が2dE3,22Ac (2dE-3,22-diacetate) であることが明らかとなった。

### 3) UKE-7のアセチル化

UKE-7 (100  $\mu$ g) のアセチル化についても2dEと同様の手順で行ったところ, UKE-7のアセテート (Rf 0.516) を得た。このUKE-7-アセテートは分析用 RP-HPLC (システム14) において, 5.8 分に溶出した。

UKE-7-アセテートの<sup>1</sup>H-NMRデータ (重クロロホルム中, 表6) において, 2dE3,22Acと比較し, それぞれの値が近似していることから, 18位, 19位, 26位および27位の4個のメチル基の水素, 7位のオレフィン水素, 9位と5位のメチン水素が容易に帰属された (表6)。また, 1個のメチル基の水素 ( $\delta$  1.025 ppm) は, 表5で示した重メタノール中での測定結果と同様に, 2dEより低磁場にシフトし, その形状がdoubletであることから, 21位のメチル基の水素と帰属した。さらに $\delta$  2.04 ppmと $\delta$  2.06 ppmにメチルの水素 ( $\text{CH}_3 \times 2$ ) を確認できたことから, UKE-7-アセテートも2dE3,22Acと同様にアセチル基を2個有することが明らかとなった。そして, 2dE3,22Acの3位の水素とほとんど同じ位置の化学シフトと同じ形状を有する水素が $\delta$  5.08 ppmに得られたことから, UKE-7-アセテートはA環の環境が2dEと等しく, そして3位にアセチル基を有することが明らかとなった。



一方, 2dE3,22Acの22位の水素の位置に相当する領域には水素を消失していることと, 代わりにこの領域よりさらに低磁場の $\delta$  5.17 ppmに1H分のオキシメチンシグナルを確認したことから, UKE-7-アセテートのもう一つのアセチル基は22位以外の位置であり, 23位あるいは24位の可能性が高まった。

以上の結果, 最終的にUKE-7-アセテートは, 2,22-dideoxy-23(R)-hydroxyecdysone-3,23-diacetate, 2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone-3,23-diacetate, 2,22-dideoxy-24(R)-hydroxyecdysone-3,24-diacetate または2,22-dideoxy-24(S)-hydroxyecdysone-3,24-diacetateの可能性が考えられた。このことから, UKE-7は23(R)-OH体, 23(S)-OH体, 24(R)-OH体および24(S)-OH体の可能性が導かれた。

これら23位あるいは24位に水酸基を有する既知のエクジステロイドを検索したところ, 多くのBrassinosteroids (Abe et al., 1983; Yokota et al., 1982) が挙げられた。これらの化合物は, 23位の水酸基のみならず, 24位にメチル基などを有する構造であることから, UKE-7-アセテートの側鎖のNMRデータとの比較に適當ではなかった。また, Garadiasterone (20,23( $\xi$ ))E, Guerriero et al., 1986) も23位に水酸基を有するエクジステロイドとして挙げられたが, この化合物は23位の立体配置が決定されていなかった。以上のように既知のエクジステロイドにおいて, 比較に該当する化合物は得られなかった。

しかし, 既知のステロールを検索したところ, UKE-7として推定した化合物のうち, 23(R)-OH体と23(S)-OH体と等しい側鎖構造を有する化合物として, 23(R),25Cと23(S),25Cが挙げられた (Hirano et al., 1983)。

#### 4) 23(R),25-dihydroxycholesterol と 23(S),25-dihydroxycholesterol のアセチル化

23(R),25Cと23(S),25Cは既報 (Hirano et al., 1983) に従い合成した。これら2種のステロール (いずれも1 mg) を, 2dEと同一条件下にてアセチル化を行った。そして得られた化合物23(R), 25C-アセテートと23(S),25C-アセテートをUKE-7-アセテートと同一条件下の $^1\text{H}$  NMRデータ (重クロロホルム中, 表6)

を直接比較し, さらにUKE-7-アセテートの帰属を試みた。

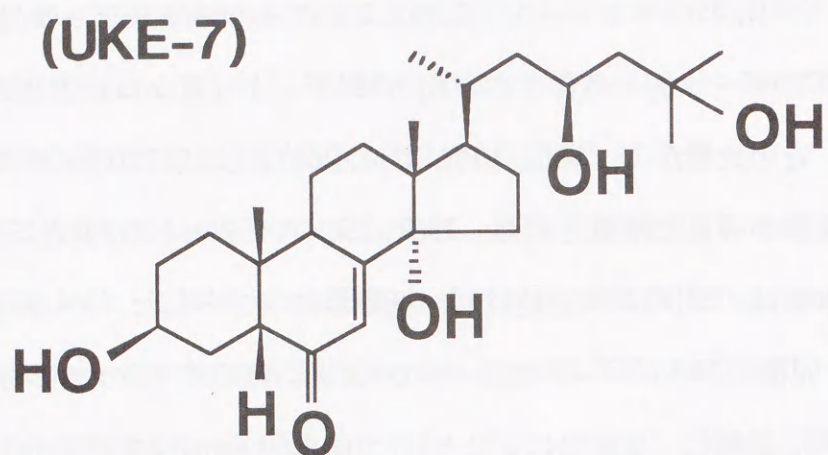
まず, 23(R),25C-アセテートと23(S), 25C-アセテートのデータは23(R),25Cと23(S),25Cのデータ同一条件下の $^1\text{H}$  NMRデータ (重クロロホルム中, データは省略) との比較から, 18位, 19位, 21位, 26位および27位のメチル基と6位のメチン水素が容易に帰属された。23(R),25C-アセテートの3位と23位のオキシメチン水素は, 23(R),25Cと比較し, 低磁場にシフトした ( $\delta$  4.60 ppm と  $\delta$  5.22 ppm)。同様に23(S),25C-アセテートの3位と23位のオキシメチン水素は, 23(S),25Cと比較し, 低磁場にシフトした ( $\delta$  4.60 ppm と  $\delta$  5.14 ppm)。さらに, 23(R), 25C-アセテートでは $\delta$  2.03 ppm と  $\delta$  2.05 ppm に, そして23(S),25C-アセテートでは,  $\delta$  2.05 ppm に各々2個分のメチル基を確認した。

以上のことから, 23(S),25C-アセテートと23(R),25C-アセテートはどちらも3位と23位がアセチル化された23(S),25C3,23Ac (23(S),25C-3,23-diacetate) と23(R),25C-3,23Ac (23(R),25C-3,23-diacetate) であると明らかとなった。

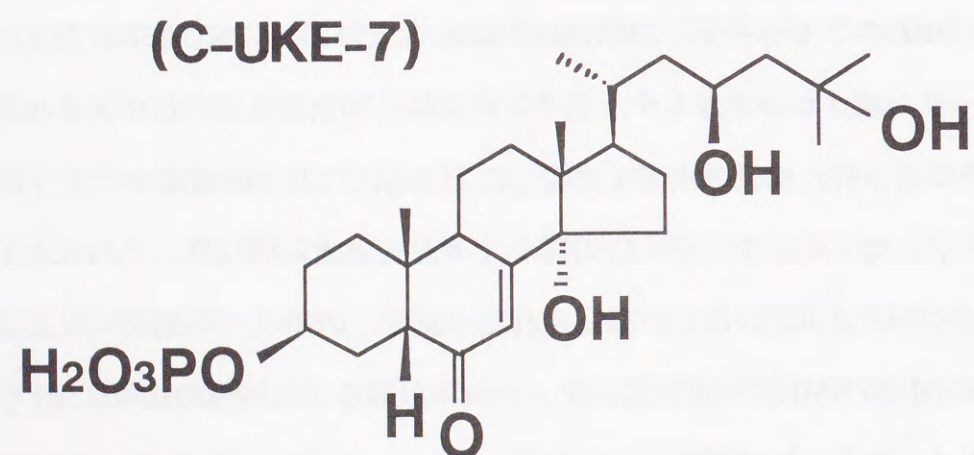
次に, UKE-7-アセテート, 23(R),25C3,23Acおよび23(S),25C3,23Acの $^1\text{H}$  NMRデータ (重クロロホルム中, 表6) の21位, 26位および27位のメチル基とアセチル化された位置の水素を比較したところ, これらの値はすべて近似した値を示した。そして, とくにUKE-7-アセテートと23(S),25C3,23Acにおいて, 極めてその値が近いことが確認された。また, UKE-7, 23(R),25Cおよび23(S),25Cの $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中, 表5) の同様の比較においても, UKE-7と23(S),25Cの類似性が確認された。

以上のことから, UKE-7-アセテートは2,22d23(S)E-3,23-diacetateであると明らかになった。そしてUKE-7は最終的に2,22d23(S)E (2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone) であると結論づけられた (図32)。また, 2,22d23(S)E, 2,22d23(S)E3,23Ac, 2dEおよび2dE3,22AcのEI-MSスペクトルにおいて各々分子イオンと同時に, それぞれ推定されたフラグメンテーションに基づく特徴的なピーク (2,22d23(S)EのEI-MSデータ;  $m/z$  448  $[\text{M}]^+$ , 430  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 420  $[\text{M}-$





**2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone**



**2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone 3-phosphate**

図 32 カイコの卵エクジステロイドとして決定された遊離型エクジステロイドと抱合型エクジステロイドの構造

$\text{CO}]^+$ ,  $415 [\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $412 [\text{M}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$ ,  $402 [\text{M}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $397 [\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$ ,  $384 [\text{M}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$ ,  $313 [\text{M}-(\text{C}22\rightarrow\text{C}27)-\text{H}_2\text{O}]^+$  および  $303 [\text{M}-(\text{C}20\rightarrow\text{C}27)]^+$ ; 側鎖の水酸基は2個分に相当, 2,22d23(S)E以外のEI-MS データは省略)を確認した. このことから, 上述の化合物においてその側鎖の構造の妥当性が確認された.

#### 6-10. C-UKE-7の構造解析

C-UKE-7は, ネガティブイオンFAB-MSスペクトル (図25-c) において  $m/z$  527にM-Hイオンピークが認められたことから, 本品の分子量は528 Daであると決定した. 前節の結果からUKE-7 (2,22d23(S)E) の分子量は448 Daであるため, C-UKE-7はUKE-7のモノリン酸エステルと考えられた.

次に, C-UKE-7は2,22d23(S)Eと $^1\text{H}$  NMRデータ (重メタノール中, 表5) を直接比較した. 両者のNMRスペクトルは前述に示したリン酸型とその抱合型との比較 (6-3,6-5,6-6,6-7および6-8節) と同様にほとんどのシグナルの化学シフトと形状の一致が確認され, またC-UKE-7のNMRデータにおいて, 3位の水素はUKE-7の3位 ( $\delta$  3.91 ppm) と異なる $\delta$  4.59 ppmに観察されたことから, 3位にリン酸基が結合していることが支持された. また, 既知の2,22d20E3Pと2,22d20Eの同一条件下で測定されたデータ (Ohnishi et al., 1989) においても, それぞれの3位のデータは上記の値と酷似していた. 以上の結果から, C-UKE-7は2,22d23(S)E3P (2,22-dideoxy-23(S)-hydroxyecdysone 3-phosphate) であると結論づけられた (図32).

#### 7. 22d20Eのオゾン酸化 (3-デヒドロ体の合成)

今回, カイコの成熟卵巣および産卵後10日目の休眠卵の遊離型エクジステロイド内に22d20Eが検出され, また同時に22d20E' (Mamiya et al., 1995) の存在も知られていることから, これらの中間体である, 3D22d20Eもカイコの遊離型エクジステロイドとして存在する可能性が考えられた (詳細は後述の考



察に記す)。そこで、イチイ由来の22d20E精製標品から3D22d20Eを合成し、RP-HPLC(システム1)にて、その溶出位置を調べた。そして、卵巣および卵由来の遊離型エクジステロイドのRP-HPLC/RIA分析(図3と図10)において、3D22d20Eの溶出位置に、RIAによるエクジステロイド活性あるいはUV吸収が得られているかを確認した。しかし、これまで22d20Eから3D22d20Eの合成はなされていないことから、既報(Dinan and Rees, 1978)に示されている、20Eから3D20Eの合成の原理に基づき3D22d20Eの合成を行った。また、その合成と同時に20Eから3D20Eを合成し、3D22d20Eの合成標品との $^1\text{H}$  NMRデータの比較に用いた。

20Eから3D20Eの合成。20E(2.5 mg)に $\text{PtO}_2$ (3 mg)と $\text{H}_2\text{O}$ (2.5 ml)を加え、室温で3時間オゾンを通じ、攪拌する。 $\text{PtO}_2$ 末をフロリジルフィルターにて濾過(MeOHで洗浄)して除去し、濾液を減圧下で濃縮し、TLC(溶媒5)にて展開した。TLCにて未反応物(20E, Rf 0.189)と20E酸化物(Rf 0.385)を得た。20E酸化物は最終的に0.5 mg得られた。20E酸化物( $\text{CD}_3\text{OD}$ )のデータ: $^1\text{H}$  NMR  $\delta$ : [0.919 (A) 0.880 (B) 0.880 (C) (s, 18-Me)], [0.946 (A) 0.919 (B) 0.919 (C) (s, 19-Me)], [1.038 (A) 1.023 (B) 1.023 (C) (s, 21-Me)], [1.183 (A) 1.196 (B) 1.196 (C) (2s, 26/27-Me)], [3.48 (A) 3.54 (B) 3.16 (C) (m, 9-H)], [4.52 (A) 3.74 (B) 3.83 (C) (m, w1/2= 22Hz, 2-H)]および[5.86 (A) 5.82 (B) 5.80 (C) (m, 7-H)]。

本品は、 $^1\text{H}$ -NMR データより(A), (B)および(C)の3種の化合物[(A):(B):(C) = 83:10:40]の混合物の可能性が考えられた。このため、これらを精製後、再び再結晶し同一条件下にて $^1\text{H}$ -NMR を測定した。しかし、ほとんど上述のデータと一致するスペクトルデータを確認した(NMRデータは省略)。しかし、既報において、3-デヒドロ体のエクジステロイドは重水中で測定したNMRスペクトルでは2種類(Girault et al., 1989)、重メタノール中で測定したNMRスペクトルでは3種類(Howarth et al., 1989)の形状を示し、そして重ピリジン中で測定したNMRスペクトルでは1種類(Howarth et al., 1989)の形状を示すこと

が報告されている。これらを考えあわせると、合成標品は混合物ではなく、重メタノール中で3D20E、3D20Eの $3\alpha$ - $^2\text{H}_3$ -hemiacetal体および3D20Eの $3\beta$ - $^2\text{H}_3$ -hemiacetal体となったため、上述のようなスペクトルとなり、最終的に合成標品は3-デヒドロ体であると結論づけられた。

22d20Eの酸化反応についても、同様の手順で、22d20E(30 mg),  $\text{PtO}_2$ (40 mg),  $\text{H}_2\text{O}$ (27 ml), 反応時間1.5 時間にて行ったところ、未反応物(22d20E, Rf 0.224)と22d20E酸化物(Rf 0.479, 5.8 mg)を得た。次いで、22d20E酸化物をEtOAcから再結晶すると無色針状結晶(3.0 mg, mp 167-168  $^{\circ}\text{C}$ )を得た。

22d20E酸化物( $\text{CD}_3\text{OD}$ )のデータ: $^1\text{H}$  NMR  $\delta$ : [0.889 (A) 0.850 (B) 0.850 (C) (s, 18-Me)], [1.039 (A) 0.947 (B) 0.947 (C) (s, 19-Me)], [1.292 (A) 1.273 (B) 1.273 (C) (s, 21-Me)], [1.187 (A) 1.173 (B) 1.173 (C) (2s, 26/27-Me)], [3.50 (A) 溶媒に埋没 (B) 3.17 (C) (c, 9-H)], [4.51 (A) 3.74 (B) 3.84 (C) (m, w1/2=20Hz, 2-H)]および[5.87 (A) 5.84 (B) 5.82 (C) (c, 7-H)]。

本品の $^1\text{H}$  NMRスペクトルは、3D20Eのスペクトルと同様に(A), (B)および(C) ((A):(B):(C) = 45:7:19)の3種の形状を示した。これらは精製後に再び再結晶し、同一条件下の $^1\text{H}$ -NMR 測定においても同様に3種の形状を示した

(NMRデータは、ほとんど一致することから省略、(A)が3D22d20E、(B)と(C)は、いずれかが3D22d20Eの $3\alpha$ - $^2\text{H}_3$ -hemiacetal体および3D22d20Eの $3\beta$ - $^2\text{H}_3$ -hemiacetal体となる)。本品は、20Eから合成した3D20E標品、22d20E標品と直接 $^1\text{H}$ -NMRデータを比較した結果、3D20E標品と同様に、混合物である可能性は否定され、最終的に合成標品3D22d20Eと同定した。

得られた3D22d20EのRP-HPLC(システム1)による分析およびカイコの遊離型エクジステロイドとの比較は、後述の考察内に記す。

## 8. カイコ蛹の分離腹部における22d20Eの生物活性

正常の発育を遂げるカイコの場合、蛹化直後の1日あるいは2日の間に、前



胸腺から分泌されるEがカイコ卵巣の発育を促し、その重量の増加が示される (Chatani and Ohnishi, 1976)。反対に蛹化直後のカイコ蛹の胸部と腹部間を結紮することにより、卵巣の発育が完全に抑制されることは既に知られている (Fukuda, 1940, 1944)。さらに、上述のような結紮にて得られた、分離腹部に20Eを注射することにより、卵巣の発育が開始されることも明らかである (Chatani and Ohnishi, 1976)。このようにカイコの卵巣の発育とエクジステロイドの関与が明白であるため、これらを利用し、エクジステロイドの生物活性の検定にカイコの分離腹部はよく用いられる。そこで、今回カイコで新たに得られたエクジステロイドのうち、20Eと最も構造の類似性を有する、22d20Eの生物活性を分離腹部を用いて調べた。

まず、正常発育を遂げるカイコ蛹の卵巣を蛹化後24時間毎に摘出し、それらの重量を測定した。1個体あたりの卵巣の重量は、蛹化後3日目に約23.0 mg (3個体の平均値)、6日目に155.3 mg、9日目に450.0 mg、10日目に535.0 mgと増加を続け、11日目と12日目には平衡状態となった (図33)。

次に、蛹化直後のカイコ蛹の胸部と腹部間を結紮し、12日目の卵巣の重量を測定したところ、その重量と蛹化直後のカイコ蛹の卵巣の重量にほとんど差異は無かった (図33)。このことから、結紮して得られた分離腹部内の卵巣は、未成熟卵巣であることが確かめられた。そして、蛹化後12日目の分離腹部に各種濃度の20E、22d20Eおよびこれらの対象として10% EtOHを体内に注入し、それらの卵巣の重量を注射後12日目に測定した。まず、対象とされた10% EtOHを注入した分離腹部において、卵巣重量の増減は無く、未成熟卵巣であった (図34)。20Eにおいて分離腹部内の卵巣重量は、1.25  $\mu$ g/1個体を注射した場合に約78 mg (平均値)、2.5  $\mu$ g/1個体 (約220 mg)、5.0  $\mu$ g/1個体 (約330 mg) 10.0  $\mu$ g/1個体 (約400 mg) であった (図34)。そして22d20Eにおいて分離腹部内の卵巣重量は、3.75  $\mu$ g/1個体を注射した場合に約52.5 mg (平均値)、7.5  $\mu$ g/1個体 (約95.2 mg)、15.0  $\mu$ g/1個体 (約235 mg)、30.0

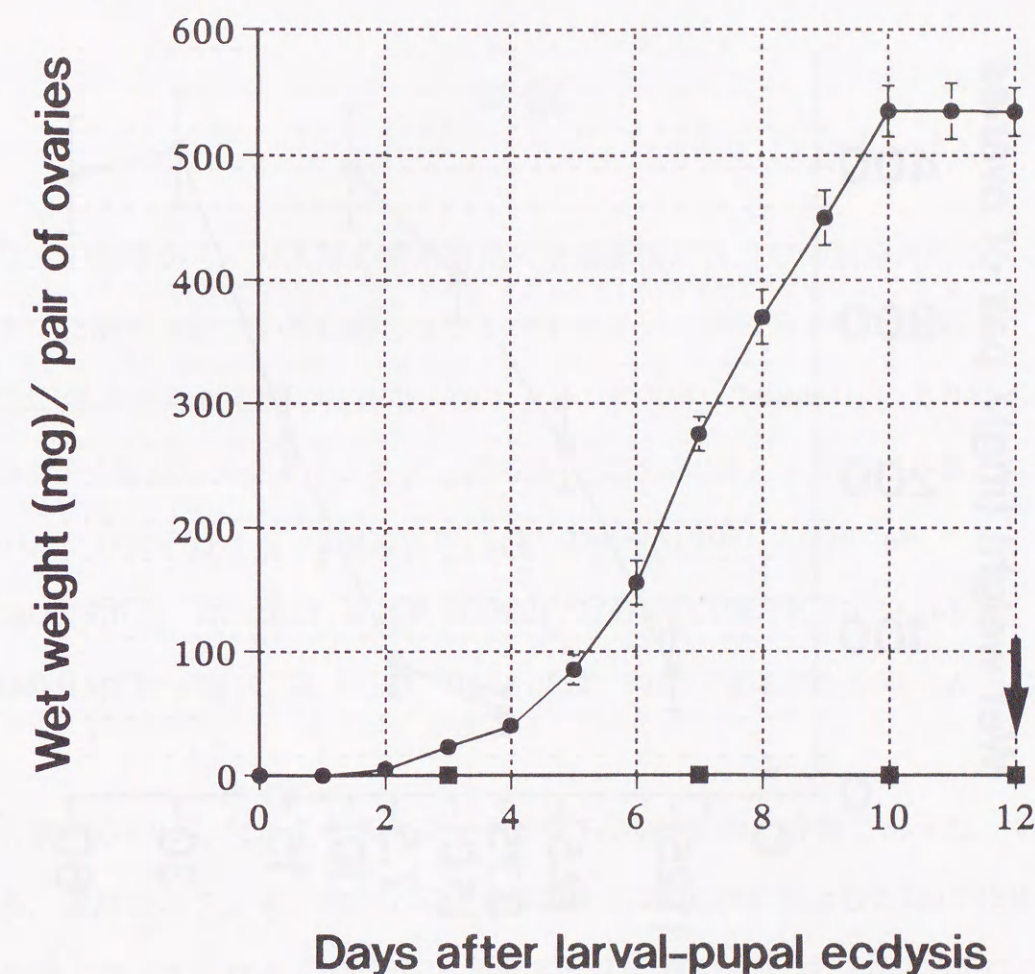


図 33 カイコの正常発育時の蛹内と分離腹部内の卵巣重量 (●) は正常発育時の蛹の卵巣重量, (■) は蛹化直後に結紮した蛹の卵巣重量を示している。縦軸は1個体あたりの卵巣重量, 横軸は蛹化後の日数, そして矢印は羽化した日を示している。



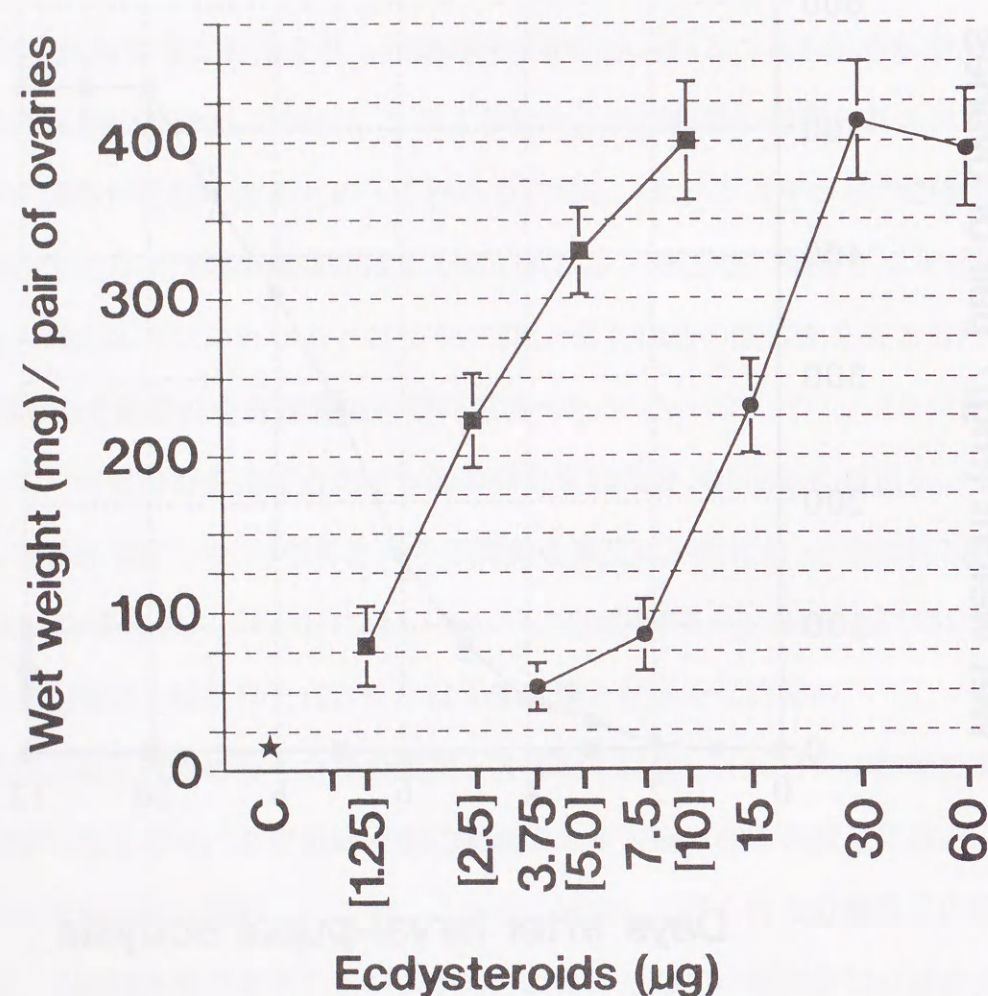


図 34 カイコの分離腹部による20Eと22d20Eの生物活性の検定  
蛹化直後に結紮し、得られた分離腹部を12日間保存後、腹部に  
各種の濃度の20E (■), 22d20E (●) あるいは、10% Et-OH  
(C, [★]) を注射し、それぞれ注射後12日目の卵巢重量を示し  
た。

μg/1個体 (約400 mg), 60.0 μg/1個体 (約400 mg) であった (図34)。以上の  
ことから、20Eの活性値を1とすると、22d20Eは約1/6であることが明らかとなっ  
た。

## 考察

以上の結果から、カイコの成熟卵巢内と産卵後10日目の休眠卵内には、こ  
れまでに解明されている12種のエクジステロイド (20E, E, 2d20E, 2dE,  
2,22d20E, Bとそれぞれの抱合型, 図1と2) に加え、Mamiyaらにより明らか  
にされた2種のエクジステロイド (22d20E' と22d20E'2P) と同様に、新たに12  
種のエクジステロイド, 22d20E, E', 2dE', 22d16(β), 20E', 22d20, 26E',  
2,22d23(S)E と, 22d20E3P, E'22P, 2dE'22P, 22d16(β), 20E'2P, 22d20, 26E'2P,  
2,22d23(S)E3P (図19, 22, 24, 27, 30および32) が存在することが明らかとなっ  
た。

今回明らかにしたエクジステロイドのうち8種は新規化合物であった。すな  
わち、遊離型エクジステロイド22d16(β), 20E', 22d20, 26E'および2,22d23(S)Eと  
抱合型エクジステロイド22d20E3P, 2dE'22P, 22d16(β), 20E'2P, 22d20, 26E'2Pお  
よび2,22d23(S)E3Pである。そして4種のエクジステロイドは既知物質であった。

既知物質である22d20Eは植物のイチイ *T. cuspidata* の乾燥葉や小枝から初め  
て分離され、その構造が決定されTaxisteroneと命名された (Nakano et al., 1982)。  
続いて、Taxisteroneは節足動物の海蜘蛛類ヨロイウミグモ *Pycnogonum littorale*  
からも同定が報告されていた (Bückmann et al., 1986)。しかし、現在まで昆  
虫からは検出されていなかった。それゆえ、今回同定された22d20Eは、昆虫  
では初めての報告である。

一方、22d20E以外の既知のエクジステロイドは、他の昆虫においては既に



報告されていた。すなわち、E'は、オオハチミツガ *Galleria mellonella* (Hsiao and Hsiao, 1979) やタバコスズメガ *M. sexta* (Kaplanis et al., 1979) の卵巣で、さらにE'22Pは、トノサマバッタ *L. migratoria* の卵で検出されていた (Tsoupras et al., 1982)。また、2dE'はサバクバッタ *Schistocerca gregaria* (Isaac et al., 1981) の卵で検出されていた。以上のことから、今回カイコの卵巣や卵に見いだされたE', E'22P, 2dE'は、昆虫に広く存在するエクジステロイドと考えることができる。

次に、新規物質の2dE'22Pであるが、この化合物と同様の2dE'のリン酸型はこれまで、2dE'3Pがトノサマバッタ *L. migratoria* (Tsoupras et al., 1982) やサバクバッタ *S. gregaria* (Rees and Isaac, 1984) の卵で検出されていた。現在までにリン酸基の結合部位として2位、3位、22位が示されており (Lafont and Wilson, 1992; Mamiya et al., 1995)、またE'においても、そのリン酸型としてE'3PとE'22Pがトノサマバッタ *L. migratoria* (Tsoupras et al., 1982) の卵で検出された。これらのことから、今回明らかにした新規物質の2dE'22Pの構造は特異的な昆虫の卵エクジステロイドとしては考えがたく、したがって、2dE'が他の昆虫の卵あるいは卵巣内に広く存在することと考えあわせて、2dE'22Pも他の昆虫内で存在する可能性が推察される。

新規物質22d20E3Pは、上述の既知物質22d20Eの抱合型エクジステロイドとして得られた。このリン酸基の結合部位については、今回明らかにした6種類の抱合型エクジステロイドと合わせて後に考察する。

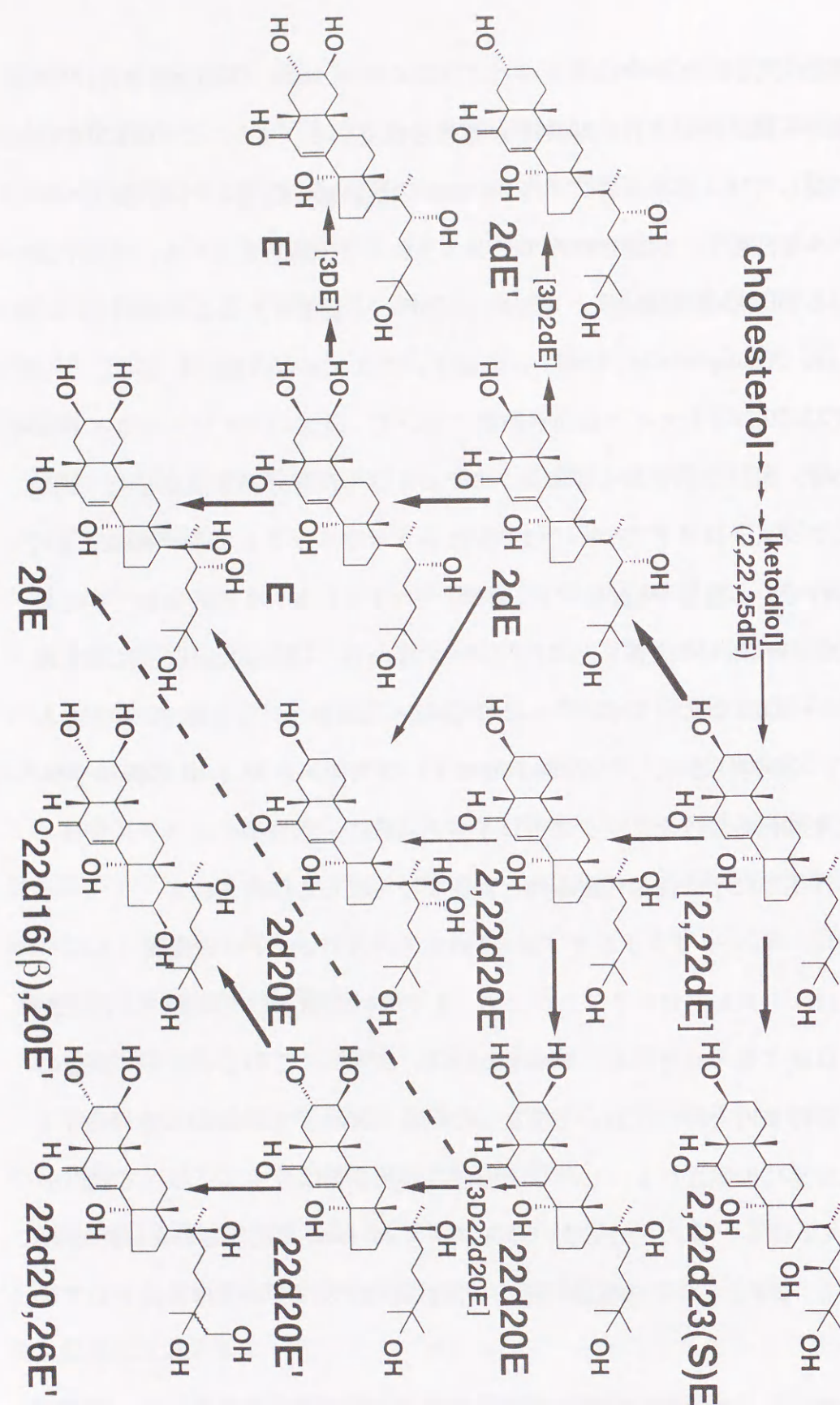
新規物質22d20,26E'と22d20,26E'2Pは、カイコにおいて始めて26位に水酸化を受けたエクジステロイドとして得られた。エクジステロイドの26位の水酸化は昆虫の成熟卵巣や発生の進んだ卵において一般的な反応であると知られており、この反応は不活性化のプロセスであると考えられている (Kaplanis et al., 1980; Koolman, 1982)。新規物質22d20,26E'と類似構造を有するエクジステロイドとして、海蜘蛛類ヨロイウミグモ *P. litorale* (Bückmann et al., 1986)

から構造決定された22d20,26Eとタバコスズメガ *M. sexta* (Kaplanis et al., 1979) の卵巣から構造決定された20,26E'が報告されている。また、この20,26E'の生合成に関しては、タバコスズメガ *M. sexta* の雌の蛹の腹部に<sup>14</sup>C標識のコレストロールを注射し、代謝されたエクジステロイドの解析において、中間代謝物である26Eが26E'を経由し、さらに20,26E'へと変換されることが明らかにされている (Thompon et al., 1988)。このタバコスズメガの例をもとにして、新規物質22d20,26E'もカイコの卵や卵巣において、既知のエクジステロイドも考えあわせ、図35に示すようなエクジステロイドの代謝経路を推定した (既知の卵エクジステロイドについては、主にトノサマバッタ *L. migratoria* において証明されている経路 [Kappler et al., 1986] とカイコにおいて推定されている経路 [Ohnishi et al., 1981] をもとにした)。すなわち、2,22d20Eが以下に示す順、22d20E → 3D22d20E → 22d20E' → 22d20,26E'へと変換される可能性が考えらる。そして、今回明らかにした22d20,26E'はタバコスズメガ *M. sexta* の卵巣や卵の26位に水酸化を受けたエクジステロイドと同様に、活性型のエクジステロイドから派生した不活性型代謝産物と位置づけられると推察された。

一般に、3β-エクジステロイドから3α-エクジステロイドへの変換 (エピマー化) には、3-デヒドロエクジステロイドを中間代謝物として酵素的に合成されることは既に知られている (Thompson et al., 1990)。このことから、前述のカイコの卵巣内と卵内において推定した経路 (図35) で3D22d20Eを経由することは容易に推定される。しかし、現在この化合物はカイコにおいて検出がなされていない。また上述のタバコスズメガ *M. sexta* で証明された経路の例においても、26Eから26E'の変換の際の中間代謝物である3D26Eは検出されていない。

そこで、カイコの卵や卵巣内で3D22d20Eの有無を確認するために、3D22d20Eを合成した。その結果、3D22d20Eは図3と図10 (RP-HPLC, システム1) において30.7分 (フラクションナンバー62に相当) に溶出した。図3と図10





のいずれの3D22d20Eの溶出位置においてもRIA活性が得られなかったこと、またUV吸収を有するピークが示されなかったことから（図内では22d20E'に由来する活性が示されている）、カイコの成熟卵巣や産卵後10日目の休眠卵において3D22d20Eは検出されないことが明らかとなった。

またE'や2dE'においても、それぞれEと2dEから3DEと3D2dEを経由して酵素的に生合成されることは既に報告されている (Koolman and Karlson, 1978)。

前述のようにカイコの卵にはEと2dEが存在することから、カイコの卵にE'と2dE'の前駆体である3DEと3D2dEも含まれている可能性が考えられた。しかし、HPLC上で3DEと3D2dEが溶出すると予測される位置には、これらのピークは検出されなかった。

タバコスズメガ *M. sexta* では、3DEからE'への3 $\alpha$ -還元反応は、Eから3DEへの酸化反応の13-100倍速く進行することから、Eのエピマー化においてはEの酸化反応が律速段階となっていることが示されている（Weirich, 1989）。それ故、カイコ卵で3-デヒドロエクジステロイドが検出されにくいのは、カイコ卵でもタバコスズメガ *M. sexta* と同様に3 $\alpha$ -還元反応が迅速に進行している可能性を示唆している。

新規物質22d16( $\beta$ ),20E'と22d16( $\beta$ ),20E'2Pと類似した化合物は軟体動物のガーデンカタツムリ *Cepaea nemoralis* からのも得られている。ガーデンカタツムリ *C. nemoralis* の体内に $^3\text{H}$ -20Eを注入し、その身体（殻は除く）と排泄物を分析した際に得られた代謝物の中に16( $\beta$ ),20Eが見いだされており、Malacosteroneと名付けられた（Garcia et al., 1986）。現在まで非常に多くの種類のエクジステロイドが知られているが、16位が水酸化されたエクジステロイドの検出はこれら3種に限られる。22d16( $\beta$ ),20E'の生合成は水酸化の位置から考えて22d20E'から派生する不活性型の代謝産物である可能性が考えられる（図35）。また、Malacosterone（16( $\beta$ ),20E）も20Eから派生した代謝産物であることから、この可能性は強く示唆される。



新規物質2,22d23(S)Eと2,22d23(S)E3Pは23(S)位に関しては、これらと同様に23位に水酸基を有する化合物として、植物エクジステロイドのBrassinosteroids (例えばBrassinolide [(22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7-oxa-5 $\alpha$ -cholestan-6-one (Abe et al., 1983)] やCastasterone [(22R,23R,24-S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-6-one (Yokota et al., 1982)]) がある。これらは、23位のみならず24位に修飾を受け、さらにB環の構造が通常のエクジステロイドと異なる構造である。また、刺胞動物の地中海性スナギンチャク *Gerardia savaglia* からGerardiasterone (20,23( $\xi$ )E, Guerriero et al., 1986) が得られているが、この化合物は23位の立体配置の決定がなされていない。

このように、新規物質2,22d23(S)Eと2,22d23(S)E3Pは、典型的な6-en-7-one構造を有し、さらに23位に水酸基を有し、その絶対配置が明らかなエクジステロイドとして初めて明らかにされた化合物である。2,22d23(S)Eはその水酸化の位置から、2,22dEから派生した可能性(図35)が推察された。しかし、2,22dEはカイコにおいて未だ検出されていないことから、この合成系を立証するためにも、早急に2,22dEの存否を確認する必要がある。また、2,22d23-(S)Eの生物活性についても今後の解析を待たねばならない。

今回明らかにされた新規物質および既知物質を含め、カイコの卵巣および卵で明らかにされた合計26種類の卵エクジステロイドの構造の特長の一つとして、26化合物中14化合物が22位に水酸基を欠損する22-デオキシ型であることが挙げられる。一般に脱皮ホルモンである20Eの活性には22位の水酸基の存在が非常に重要であると考えられている(Horn and Bergamasco, 1985)。例えば、オオクロバエ *Calliphora vicina* の幼虫の分離腹部においては、合成標品22d20Eは20Eと比較し、その活性が1/50から1/100であると報告されている(Galbraith et al., 1969)。またカイコの蛹の分離腹部においては、Eの活性値を1と表したとき、20Eはその活性が2、2dEが1/5、2d20Eが1/3であるのに対し、

22位に水酸基を欠損する2,22d20EとBはいずれも1/100以下であり、センチニクバエ *Sarcophaga peregrina* の幼虫の分離腹部においては、20Eの活性値を1と表したとき、2dEはその活性が1、2d20Eが1であるのに対し、2,22d20Eは1/10であり、Bは活性化されなかったと報告されている(Ohnishi, 1986)。そしてカイコの幼虫を用いた検定では、イチイから精製した22d20Eは殆どその活性を示さなかった(1/100以下)と報告されている(Nakano et al., 1982)。

しかし、カイコの卵巣や卵内において、22-デオキシ型のエクジステロイドが、他の昆虫と比較し、その全体を占める割合が非常に高いことから(26化合物中14化合物が22-デオキシ型)、カイコの雌の蛹の分離腹部において、その活性を調べた。その結果、20Eと比較し約1/6という活性値を得た(図34)。この値は、オオクロバエ *C. vicina* やカイコの幼虫で得られた値(前述の結果)と比較し、かなり高い値であった。

また、この値は、上述のOhnishiによるカイコの蛹の分離腹部の実験で得られた2d20Eの活性値とほぼ等しく、また2dEよりも高い活性値であった。

HoffmannとLagueux(1985)によれば、トノサマバタ *L. migratoria* の胚発生において、20E、Eとともに2dEも生物活性があると示唆されている。このようなことを考え合わせると、22d20Eは、カイコの卵巣の発育を目安に検定した場合には活性が高いことから、22d20Eはカイコの卵巣や卵で何らかの生理作用を果たしている可能性、もしくはカイコの卵巣や卵内に、この種に特有の20位の水酸化酵素が存在し、22d20Eを20Eに変換している可能性のいずれかが考えられる。そして、もし後者の可能性が正しいならば、カイコの卵巣や卵のエクジステロイドの活性化のための20Eまでの、水酸化の順序は、既に証明のなされているC-25  $\rightarrow$  C-22  $\rightarrow$  C-2  $\rightarrow$  C-20の経路だけでなく、新たにC-25  $\rightarrow$  C-2  $\rightarrow$  C-22  $\rightarrow$  C-20の経路の可能性も考慮しなければならない(図35)。

今回明らかにした抱合型を含め、カイコの卵巣内と卵内に存在する13種の抱合型エクジステロイドは全てリン酸エステルであった。これらの結合部位



は上述の新規物質2dE'22Pで示したように、2級水酸基（2位、3位および22位）のいずれかの位置であった。これらカイコの抱合型エクジステロイドのリン酸化部位を注意深く観察すると、以下のようなリン酸化の優先順位があることが明らかとなった。まず、22位に水酸基を有するエクジステロイド（22-hydroxyecdysteroids）では、22位が優先的にリン酸化される（E22P, 20E22P, 2dE22P, 2d20E22P, E'22Pおよび2dE'22P）、次に、22位に水酸基を欠損し、その3位の水酸基がβ位に結合しているエクジステロイド（22-deoxy-3β-hydroxyecdysteroids）では、3位にリン酸基が結合している（2,2220E3P, B3P, 2,22d23-(S)E3P）、しかし、22位に水酸基を欠損し、その3位の水酸基がα位に結合しているエピマー体（3-epi-22-deoxyecdysteroids）では、2位がリン酸化される（22d20E'2P, 22d16(β),20E'2P, 22d20,26E'2P）。

実際、カイコの卵巣内では、数種の遊離型エクジステロイドを基質とし、エクジステロイドリン酸エステルの形成を触媒する酵素（ATP: ecdysteroid phosphotransferase, ecdysteroid kinase）の存在が示唆されている（Takahashi et al., 1992）。そして、リン酸化部位の特長から、このカイコのATP: ecdysteroid phosphotransferaseは、厳密な基質特異性があると推定される。またカイコの休眠卵では、抱合型のエクジステロイドも産卵後急激に増加することから（Sonobe et al., 1992）、休眠卵では産卵後にATP: ecdysteroid phosphotransferase活性が急激に上昇するものと予測されている。このように前述のエピマー化に関係する酵素、水酸化に関係した酵素、そしてATP: ecdysteroid phosphotransferaseなど、エクジステロイド代謝に関する酵素系の研究も今後進める必要があろう。

## 引用文献

- Abe H., Morishita T., Uchiyama M., Takatsuto S., Ikekawa N., Ikeda M., Sassa T., Kitsuwa T. and Marumo S. (1983) Occurrence of three new brassinosteroids: brassinone, (24S)-24-ethylbrassinone and 28-norbrassinolide, in higher plants. *Experientia* **39**, 351-353.
- Bückmann D., Starnecker G., Tomascko K. -H., Wilhelm E., Lafont R. and Girault J. -P. (1986) Isolation and identification of major ecdysteroids from the pycnogonid, *Pycnogonum litorale* (Strom) (Arthropoda, Pantopoda). *J. Comp. Physiol.* **27**, 51-58.
- Chatani F. and Ohnishi E. (1976) Effect of ecdysone on the ovarian development of *Bombyx* silkworm. *Dev. Grow. Diff.* **18**, 481-484.
- Dammeier B. and Hoppe W. (1971) Die kristall- und molekül strukturanalyse - des - insekten-hautungs-hormons 20-hydroxy-ecdysone (ecdysterone). *Chem. Ber.* **104**, 1660-1673.
- Dinan L. N. and Rees H. H. (1978) Preparation of 3-epi-ecdysone and 3-epi-20-hydroxyecdysone. *Steroids* **32**, 629-638.
- Fukuda S. (1940) Induction of pupation in silkworm by transplanting the prothoracic gland. *Proc. Imp. Acad. Tokyo.* **16**, 414-416.
- Fukuda S. (1944) The hormonal mechanism of larval molting and metamorphosis in the silkworm. *J. Fac. Sci., Tokyo Imp. Univ., Sec. IV.* **6**, 477-532.
- Galbraith M. N. and Horn D. H. S. (1969) Insect molting hormones: crustecdysone (20-hydroxyecdysone) from *Podocarpus elatus*. *Aust. J. Chem.* **22**, 1045-1057.
- Galbraith M. N., Horn D. H. S., Middleton E. J. and Hackney R. J. (1969) Molting hormones of insects and crustaceans: the synthesis of 22-deoxy-crustecdysone. *Aust. J. Chem.* **22**, 1517-1524.



- Garcia M., Girault J. -P. and Lafont R. (1986) Ecdysteroid metabolism in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis* (L.). *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* **9**, 43-58.
- Girault J. -P. and Lafont R. (1988) The complete <sup>1</sup>H-NMR assignment of ecdysone and 20-hydroxyecdysone. *J. Insect Physiol.* **34**, 701-706.
- Girault J. -P., Beydon P., Blais C., Rolando C. and Lafont R. (1989) Synthesis and nuclear magnetic resonance study of 3-dehydroecdysteroids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **10**, 199-213.
- Guerriero A., Traldi P. and Pietra F. (1986) Gerardiasterone, a new ecdysteroid with a 20,22,23,25-tetrahydroxylated side chain from the Mediterranean Zoanthid *Gerardia savaglia*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 40-41.
- Hampshire F. and Horn D. H. S. (1966) Structure of crustecdysone, a crustacean moulting hormone. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 37-38.
- Hirano Y., Eguchi T., Ishiguro M. and Ikekawa N. (1983) Configuration at the C-23 position of 23-hydroxy- and 23,25-dihydroxycholesterols. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 394-400.
- Hoffman J. A. and Lagueux M. (1985) Endocrine aspects of embryonic development in insects. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Vol. 1, pp. 435-460. Pergamon Press, Oxford.
- Horn D. H. S. and Bergamasco D. R. (1985) Chemistry of ecdysteroids. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Vol. 7, pp. 185-248. Pergamon Press, Oxford.
- Howarth O. W., Thompson M. J. and Rees H. H. (1989) Reaction of 3-dehydroecdysone with certain n.m.r. solvents. *Biochem. J.* **259**, 299-302.
- Hsiao T. H. and Hsiao C. (1979) Ecdysteroids in the ovary and egg of the greater wax moth. *J. Insect Physiol.* **25**, 45-52.

- Ikekawa N., Eguchi T., Hirano Y., Tanaka Y., DeLuca H. F., Itai A. and Iitaka Y. (1981) Synthesis and determination of the configuration of 23,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>; a new metabolite of vitamin D<sub>3</sub>; x-ray crystal structure of a 3,23,25-triol precursor. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1157-1159.
- Ikekawa N., Ikeda T., Mizuno T., Ohnishi E. and Sakurai S. (1980) Isolation of a new ecdysteroid, 2,22-dideoxy-20-hydroxyecdysone, from the ovaries of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 448-449.
- Isaac R. E. and Rees H. H. (1984) Isolation and identification of ecdysteroid phosphates and acetylcysteroid phosphates from developing eggs of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem. J.* **221**, 459-464.
- Isaac R. E., Rees H. H. and Goodwin T. W. (1981) Isolation of 2-deoxy-20-hydroxyecdysone and 3-epi-2-deoxyecdysone from eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria* during embryogenesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 418-420.
- Isaac R. E., Rose M.E., Rees H. H. and Goodwin T. W. (1982) Identification of ecdysone-22-phosphate and 2-deoxyecdysone-22-phosphate in eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, by fast atom bombardment mass spectrometry and N. M. R. spectroscopy. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 249-251.
- Kamba M., Mamiya Y., Sonobe H. and Fujimoto Y. (1994) 22-Deoxy-20-hydroxyecdysone and its phosphoric ester from ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 395-402.
- Kamba M., Sonobe H., Mamiya Y., Yoshida K., Hara N. and Fujimoto Y. 22-Deoxyecdysteroids from ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* in preparation.
- 勘場麻里, 園部治之, 間宮祥隆, 原 典行, 藤本善徳 (1995) カイコの休眠卵に見いだされた未同定エクジステロイド, とくに3-エピエクジステロイドの構造解析について. 日本蚕糸学雑誌 in press.



- Kaplanis J. N., Thompson M. J., Dutky S. R. and Robbins W. E. (1979) The ecdysteroids from the tobacco hornworm during pupal-adult development five days after peak titer of molting hormone activity. *Steroids* **34**, 333-345.
- Kaplanis J. N., Thompson M. J., Dutky S. R. and Robbins W. E. (1980) The ecdysteroids from young emgryonated eggs of the tobacco hornworm. *Steroids* **36**, 321-335.
- Kappler C., Goltzene F., Lagueux M., Hetru C. and Hoffmann J. A. (1986) Role of the follicle cells and the oocytes in ecdysone biosynthesis and esterification in vitellogenic females of *Locusta migratoria*. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* **9**, 17-34.
- Koolman J. (1982) Ecdysone metabolism. *Insect Biochem.* **12**, 225-250.
- Koolman J. and Karlson P. (1978) Ecdysone oxidase: reaction and specificity. *Eur. J. Biochem.* **89**, 453-460.
- Lafont R. D. and Wilson I. D. (1992) "The ecdysone handbook", p. 392., The Chromatographic Society, Nottingham.
- Lafont R., Koolman J. and Rees H. H. (1993) Standard abbreviations for common ecdysteroids. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**, 207-209.
- Lagueux M., Hetru C., Goltzene F., Kappler C. and Hoffmann J. A. (1979) Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* **25**, 709-723.
- Mamiya Y., Sonobe H., Yoshida K., Hara N. and Fujimoto Y. (1995) Occurrence of 3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone and its phosphoric ester from diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Experientia* in press.
- Nakano K., Nohara T., Tomimatsu T. and Nishikawa M. (1982) A phytoecdysteroid, taxisterone, from *Taxus cuspidata*. *Phytochemistry*. **21**, 2749-2751.
- Ohnishi E. (1986) Ovarian ecdysteroids of *Bombyx mori*: retrospect and prospect. *Zool. Sci.* **3**, 401-407.

- Ohnishi E. and Chatani F. (1977) Biosynthesis of ecdysone in the isolated abdomen of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Grow. Diff.* **19**, 67-70.
- Ohnishi E., Ohtaki T. and Fukuda S. (1971) Ecdysone in the eggs of *Bombyx mori* silkworm. *Proc. Jap. Acad.* **47**, 413-415.
- Ohnishi E., Mizuno T., Ikekawa N. and Ikeda T. (1981) Accumulation of 2-deoxyecdysteroids in ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **11**, 155-159.
- Ohnishi E., Hiramoto M., Fujimoto Y., Kakinuma K. and Ikekawa N. (1989): Isolation and identification of major ecdysteroid conjugates from the ovaries of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **19**, 95-101.
- Rees H. H. (1989) Zooecdysteroids: Structures and Occurrence. In *Ecdysone - From Chemistry to Mode of Action* (Koolman J. ed.), pp. 28-38, Thieme, Stuttgart.
- Rees H. H. and Isaac R. E. (1984) Biosynthesis of ovarian ecdysteroid phosphates and their metabolic fate during embryogenesis in *Schistocerca gregaria*. In *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones* (Hoffmann, J. and Pochet, M. ed.), pp. 181-185, Springer-Verlag, New York.
- Rees H. H. and Isaac R. E. (1985) Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugated compounds. In *Methods of Enzymology* (Low, J. H. and Rilling, H. C. ed.), Vol. 111, pp. 377-410, Academic Press, London.
- Rudel D., Bathori M., Gharbi J., Girault J.-P., Racz I., Melis K., Szendrei K. and Lafont R. (1992) New ecdysteroids from *Serratula tinctoria*. *Planta Medica* **58**, 358-364.
- Smith W. B. and Newsoroff G. P. (1974). An n. m. r. technique for carbon-5 configurations in 6-keto- $\Delta^7$ -steroids. *Steroids* **23**, 579-583.
- Sonobe H., Kamba M., Ohta K., Ikeda M. and Naya Y. (1991) *In vitro* secretion of



- ecdysteroids by Y-organ of the crayfish, *Procambarus clarkii*, *Experientia* **47**, 948-952.
- Sonobe H., Masumoto T., Mamiya Y., Kanda T. and Tamura T. (1992) Ecdysteroids during early embryogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*, *Zool. Sci.* **9**, 1270.
- Takahashi S. Y., Okamoto K., Sonobe H., Kamba M. and Ohnishi E. (1992) *In vitro* synthesis of ecdysteroid conjugates by tissue extracts of the silkworm, *Bombyx mori*, *Zool. Sci.* **9**, 169-174.
- Takemoto T., Ogawa S. and Nishimoto N. (1967a) Isolation of the moulting hormones of insects from *Achyranthis Radix*. *Yakugaku Zasshi* **87**, 325-327.
- Takemoto T., Ogawa S. and Nishimoto N. (1967b) Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*. II. Isolation of the moulting hormones. *Yakugaku Zasshi* **87**, 1469-1473.
- Thompson M. J., Weirich G. F. and Svoboda R. (1990) Metabolism of insect molting hormones: bioconversion and titer regulation. In *Morphogenetic Hormones of Arthropods* (Edited by Gupta A. P.), Vol. 1, pp. 325-360. Rutgers University Press, London.
- Thompson M. J., Svoboda R., Lozano R. and Wilzer Jr. K. R. (1988) Profile of labeled free and conjugated ecdysteroid acids during embryonic development of *Manduca sexta* (L.) following maternal incorporation of [<sup>14</sup>C]cholesterol. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **7(3)**, 157-172.
- Tsoupras G., Hetru C., Luu B., Lagueux M., Constantine E. and Hoffmann J. A. (1982) The major conjugates of ecdysteroids in young eggs and in embryos of *Locusta migratoria*, *Tetrahedron Lett.* **23**, 2045-2048.
- Warren J. Y., Steiner B., Dorn A., Pak M. and Gilbert L. I. (1986) Metabolism of ecdysteroids during the embryogenesis of *Manduca sexta*, *J. Liquid Chromatog.* **9**, 1759-1782.

- Warren J. Y. and Gilbert L. I. (1986) Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*, *Insect Biochem.* **16**, 65-82.
- Weirich G. F. (1989) Enzyme involved in ecdysone metabolism. In *Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action* (Edited by Koolman J.), pp. 174-180. Thieme, Stuttgart.
- Yokota T., Arima M. and Takahashi N. (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall, *Tetrahedron Lett.* **23**, 1275-1278.



## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際し始終懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました恩師  
甲南大学理学部 園部治之教授に衷心より御礼申し上げます。

卵エクジステロイドの抽出、精製およびHPLCの御指導に始まり、さらに数々  
の御教示を賜りました、エクジステロイド研究の先駆者として知られる、岡  
山理科大学基礎理学科 大西英爾教授に厚く御礼申し上げます。

NMRおよびMSについて、多大な御指導を賜りました、東京工業大学理学部  
藤本善徳助教授に厚く御礼申し上げます。藤本助教授の御理解ときめ細やか  
な御高配なくしては、本研究はなしえませんでした。

著者にSUNBOR SCHOLARSHIPの機会を与えて下さいました、(財)サン  
トリー生物有機科学研究所顧問 納谷洋子博士に厚く御礼申し上げます。納谷  
博士には、非常に貴重な御助言を賜りました。

RIAの御指導のみならず、抗体を恵与されました、金沢大学理学部 桜井 勝  
教授、また、植物からのTaxisteroneの抽出と精製の御指導を賜りました、徳島  
大学薬学部 中野公子博士に厚く御礼申し上げます。

本論文を御校閲頂き、御助言を賜りました、甲南大学理学部 桑田 蕃 教授、  
西野 潤 教授、中村 運 教授、辻 治雄 教授、田中 修 教授に厚く御礼申  
し上げます。また、数々の御教示を賜りました、甲南大学理学部 山田隆己 教  
授、宮澤敏夫 教授に厚く御礼申し上げます。

卵エクジステロイド分画の譲与をしていただいた、甲南大学理学部、日本  
シェーリング株式会社 間宮祥隆 氏に心から感謝致します。

NMRの測定に御協力いただいた、東京工業大学理学部 原 典行 助手、MS  
の測定に御協力いただいた、味の素株式会社中央研究所 平山和雄 博士、古屋  
真美 氏、新津宇乃 氏、湯地玲子 氏に厚く御礼申し上げます。

## 公表論文リストおよび公表論文別刷り

### 副論文

- 1) Sonobe H., Kamba M., Ohta K., Ikeda M. and Naya Y.

*In vitro* secretion of ecdysterids by Y-organ of the crayfish, *Procambarus clarkii*.  
(1991, *Experientia* **47**, 948-952.)

- 2) Takahashi S. Y., Okamoto K. Sonobe H. Kamba M. and Ohnishi E.

*In vitro* synthesis of ecdysteroid conjugates by tissue extracts of the silkworm,  
*Bombyx mori*. (1992, *Zool. Sci.*, **9**, 169-174.)

- 3) Kamba M., Mamiya Y., Sonobe H. and Fujimoto Y.

22-Deoxy-20-hydroxyecdysone and its phosphoric ester from ovaries of the  
silkworm, *Bombyx mori*. (1994, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **24**, 395-402.)

- 4) 勘場麻里, 園部治之, 間宮祥隆, 原 典行, 藤本善徳.

カイコの休眠卵に見いだされた未同定エクジステロイド、特に3-エピエク  
ジステロイドの精製と構造解析について (1995, 日本蚕糸学雑誌, 印刷中)

### 口頭発表

- 1) 勘場麻里, 園部治之.

カイコの卵巣中に存在するエクジステロイドについて. (1990年10月,  
第61回日本動物学会大会)



- 2) 園部治之, 勘場麻里, 池田みどり, 納谷洋子.

アメリカザリガニのY器官から分泌されるエクジステロイドについて.

(1990年10月, 第61回日本動物学会大会)

- 3) 池田みどり, 納谷洋子, 勘場麻里, 園部治之.

甲殻類の脱皮抑制物質について. (1990年11月, 第15回日本比較内分泌学会大会)

- 4) 勘場麻里, 園部治之, 藤本善徳.

カイコの卵巣中で新たに見いだされたエクジステロイドの構造. (1991年10月, 第16回日本比較内分泌学会大会)

- 5) Mari Kamba, Haruyuki Sonobe, Yoshinori Fujimoto.

22-Deoxy-20-hydroxyecdysone: a new ecdysteroid in mature ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. (1992年7月, 第16回国際昆虫学会議, 北京)

- 6) 勘場麻里, 園部治之, 藤本善徳.

カイコガの卵巣および卵に存在する未同定エクジステロイドの構造解析. (1993年8月, 第18回日本比較内分泌学会大会)

- 7) 奥村卓二, 勘場麻里, 園部治之, 会田勝美.

オニテナガエビにおけるY器官のエクジステロイド分泌. (1993年8月, 第18回日本比較内分泌学会大会)

- 8) 園部治之, 勘場麻里, 間宮祥隆, 藤本善徳.

カイコの卵に見いだされた新しいエクジステロイドの化学構造. (1993年11月, 第64回日本動物学会大会)

- 9) 勘場麻里, 園部治之, 吉田一紀, 原 典行, 藤本善徳.

カイコの卵巣および卵内で新たに見いだされた22-デオキシエクジステロイドの構造. (1994年10月, 第65回日本動物学会大会)

# In vitro secretion of ecdysteroids by Y-organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*

H. Sonobe<sup>a,\*</sup>, M. Kamba<sup>a</sup>, K. Ohta<sup>a</sup>, M. Ikeda<sup>b</sup> and Y. Naya<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Konan University, Higashinada-ku, Kobe 658 (Japan), and <sup>b</sup> Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618 (Japan)

Received 11 December 1990; accepted 6 March 1991

**Abstract.** It was demonstrated that excised Y-organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*, synthesize in vitro 3-dehydroecdysone (3-DHE) as the major product, together with small amounts of ecdysone. Both were identified by immunological and spectroscopic methods. The increase of ecdysteroidogenesis in the Y-organs was accompanied by an increase of the major free ecdysteroid, 20-hydroxyecdysone, in the hemolymph. This suggests a physiological role of 3-DHE, the details of which are still to be elucidated.

**Key words.** Molting hormone; ecdysteroids; 3-dehydroecdysone; Y-organ; crayfish.



