

アラキドン酸結合ホスファチジルイノシトールの合成研究

森 義裕^{a)}・海野 均・馬場 直道
(生物資源化学講座)

A Synthesis of Phosphatidylinositol Bearing Arachidonic acid

Yoshihiro Mori^{a)}, Hitoshi Umino and Naomichi Baba
(Department of Bioresources Chemistry)

Phosphatidylinositol bearing arachidonoyl group at *sn*-2 position was synthesized through preparation of partially protected myo-inositol, chemoenzymatic synthesis of an optically active lysophosphatidylcholine, introduction of an optically active *sn*-2 hydroxyl group, phospholipase D-assisted synthesis of a phosphatidic acid, and triisopropylbenzene sulfonylchloride assisted esterification of the acid with the protected myo-inositol; as a final step.

Key words : Synthesis, Phosphatidylinositol, Arachidonic acid

緒 言

イノシトールリン脂質は広く動・植物に分布しているが、量的には前者で微量に対して、後者のカビでは20%にも及び、主要な膜構成リン脂質である。イノシトールリン脂質には、最も多いホスファチジルイノシトール (PI) のほかに、イノシトール骨格のC-4位にリン酸基を有するホスファチジルイノシトール4-リン酸 (PIP) と、さらにC-5位にリン酸基を持つホスファチジルイノシトール4,5ニリン酸 (PIP₂) とがあり、これらはリン酸化、脱リン酸化によって相互に変換する。

このイノシトールリン脂質が細胞応答とのかわり早くから関心を寄せられた根拠に、このリン脂質の速い代謝回転がある。刺激によってPIが分解し、ジアシルグリセロール (DG) が生じ、ついでこれがホスファチジン酸 (PA) に変換され、さらにPIに再合成されると言う“PIサイクル”がきわめて速く起こることが多くの細胞で示されている。

PIは細胞外からのシグナルが細胞膜中の特異的受容体に結合することにより遊離される情報伝達物質の前駆体であるホルモン、神経伝達物質、光などの刺激が細胞膜のレセプターに結合することにより、ホスホリパーゼC (PLC) が働き、膜の微量成分で

あるホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸 (PIP₂) のグリセロールとリン酸の間のエステル結合を切断し、イノシトール-1,4,5-三リン酸とジアシルグリセロールを産生する。

イノシトール-1,4,5-三リン酸は細胞内小胞体に蓄えられているCa₂⁺を遊離させ、Ca₂⁺依存性酵素を活性化する。また、ジアシルグリセロールはCa₂⁺依存性プロテインキナーゼCを活性化させる。このような生体情報伝達に関わるホスファチジルイノシトールは一般にそのグリセロール骨格の *sn*-2位に高度不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸が結合していることが知られている。

これまで、ジアシル基結合リン脂質の合成例は数多く報告されているが、その合成法の多くはグリセロール骨格のキラル炭素を光学活性体にする為に多くの保護、脱保護の段階を含んでいる¹⁾²⁾。

そこで本研究では、天然に存在する物と同じイノシトール結合リン脂質の簡便な合成法の確立を目指し、ターゲットとして *sn*-2位にアラキドン酸の結

Received October 1, 2000

a) 岡山大学大学院自然科学研究科生命分子科学専攻
(Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University)

合したホスファチジン酸に位置選択的に *myo*-イノシトールを結合させる事を目的とした。

方法と結果

1. 1,2:5,6-di-*O*-シクロヘキシリデン-*myo*-イノシトール(1)の合成

天然に存在するホスファチジルイノシトールのリン酸に結合するイノシトール部位はD-体の1位であることが既に分かっている³⁾。その為、目的とするホスファチジルイノシトールを合成するには、D-体の1位以外の水酸基を保護し、ここにリン酸基をエステル結合させる必要がある。更に、その保護基は出来るだけ温和な条件で脱保護出来なければならない。そこで、本経路ではシクロヘキシリデンを保護基として用いる合成法を行った⁴⁾。

(±)-1,2:5,6-di-*O*-シクロヘキシリデン-*myo*-イノシトールの合成法は、過去に幾つか考え出されているが、本研究では *myo*-イノシトールとシクロヘキサノンとの直接反応によって合成した。なお、この方法ではスキームに示すように3種類の異性体が生成するので、反応後シリカゲルカラムにより目的物質とする(±)-1,2:5,6-di-*O*-シクロヘキシリデン-*myo*-イノシトール(1)を得た。

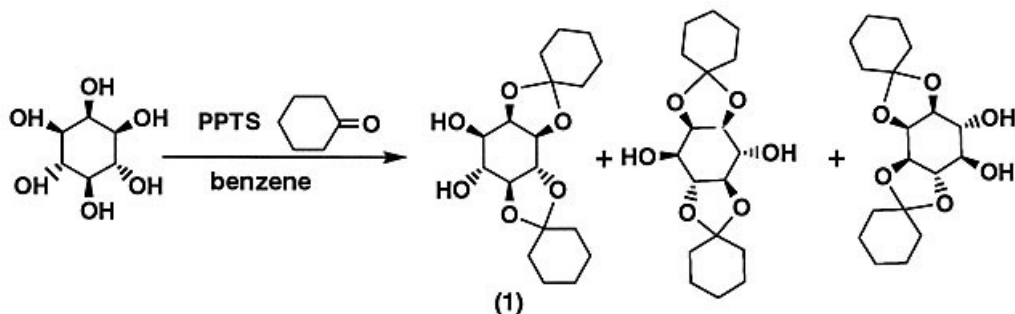
2. 1-ステアロイル-*sn*-リゾホスファチジルコリン(2)の合成⁵⁾

出発物質のグリセロールにベンゼン溶液中 *p*-TsOH を触媒とし、ベンズアルデヒドと反応させて、後処理後1,3-ベンジリデングリセロールを結晶として得た。続いて、これに塩化ベンジルと KOH を反応させる事によってグリセロールの全ての水酸基を保護した2-*O*-ベンジル-1,3-ベンジリデングリセロールを得た。続いて、これを40%エタノール中硫酸と反

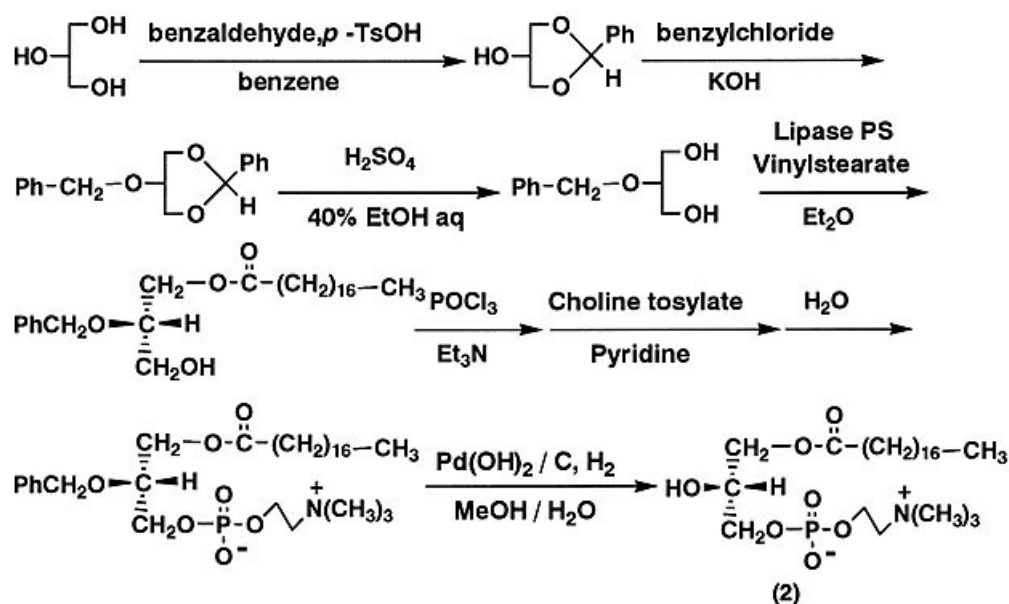
応させる事によりベンジリデン基の脱保護を行い、2-*O*-ベンジルグリセロールを合成した。この2-*O*-ベンジルグリセロールのジイソプロピルエーテル溶液に Lipase PS (天野製薬) 及びアシル化剤としてのビニルステアレートを加えて立体選択的アシル化反応を行い、光学活性なグリセロール誘導体1-ステアロイル-2-*O*-ベンジル-*sn*-グリセロールを合成した。このものの絶対配置は当研究室の米田によりR-体である事が既に決定されている。このモノアシルグリセロール誘導体に POCl₃, トリエチルアミンに続いて、ピリジン溶媒中コリントシレートを加えて攪拌し、H₂O を加える事で反応を停止させた後、クロロホルム/メタノールで生成物を抽出した。この生成物をシリカゲルカラムで精製する事により1-ステアロイル-2-*O*-ベンジル-*sn*-ホスファチジルコリンを合成した。最後に、このものを水素雰囲気下、メタノール/H₂O 混合溶媒中、水酸化パラジウム触媒を用いてベンジルエーテルの水素化分解を行い、目的物質である1-ステアロイル-*sn*-リゾホスファチジルコリン(2)を得た。

3. 1-ステアロイル-1-[(5'Z,8'Z,11'Z,14'Z)-イコサテトラエノイル]-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルイノシトール(3)の合成

アラキドン酸, DHA 等の多価不飽和脂肪酸は多くの非共役シス型二重結合を持ち、その二重結合に挟まれたメチレン基の水素はラジカルとして非常に脱離し易く、残された炭素ラジカルは転移した後、空気中の酸素と反応して容易に過酸化を生成し、これは更に分解を受ける。このような分解は BHT 等のフェノール性ラジカル捕捉剤によって防ぐことができる。従って、本節の反応は、全て BHT 存在下、窒素雰囲気下、暗条件下で反応を行った。



Scheme 1 Synthesis of 1,2:5,6-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (1).



Scheme 2 Synthesis of lyso-phosphatidylcholine (2).

本研究で用いたアラキドン酸 ((5, 8, 11, 14)-イコサテトラエン酸) はエチルエステル体の Lipase PS (天野製薬) による加水分解によって得た。このアラキドン酸と(2)をエタノールを除いたクロロホルムに溶解し、これに DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド) 及び 4-DMAP (ジメチルアミノピリジン) を加え攪拌した。反応終了後、副生成物の N, N-ジシクロヘキシルウレアをセライトろ過により除去し、濃縮後、シリカゲルカラムにより精製し、1-ステアロイル-2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 14'Z)-イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(4)を得た。続いてジエチルエーテルと0.1M酢酸緩衝液の混合物中、(4)にホスホリパーゼDを作用させてコリンリン酸エステルの加水分解を行い、1-ステアロイル-2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 14'Z)-イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸(5)を得た。

(1), (5)及び TPS-Cl (2, 4, 6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロライド) をピリジン溶媒中で2時間攪拌し、続いて等量の H₂O を加えて、同条件下で更に1時間攪拌した⁶⁾。反応後、ジエチルエーテルによる抽出、乾燥を経てイノシトール水酸基の保護された1-ステアロイル-1-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 14'Z)-イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスフォイノシトール(6)を得た。このものに THF/酢酸/H₂O (4 : 2 : 1) 混合液を48時間作用させて脱保護を行い目的物質 1-ステアロイル-1-[(5'Z, 8'Z, 11'Z,

14'Z)-イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスフォイノシトール(7)を得た。

考 察

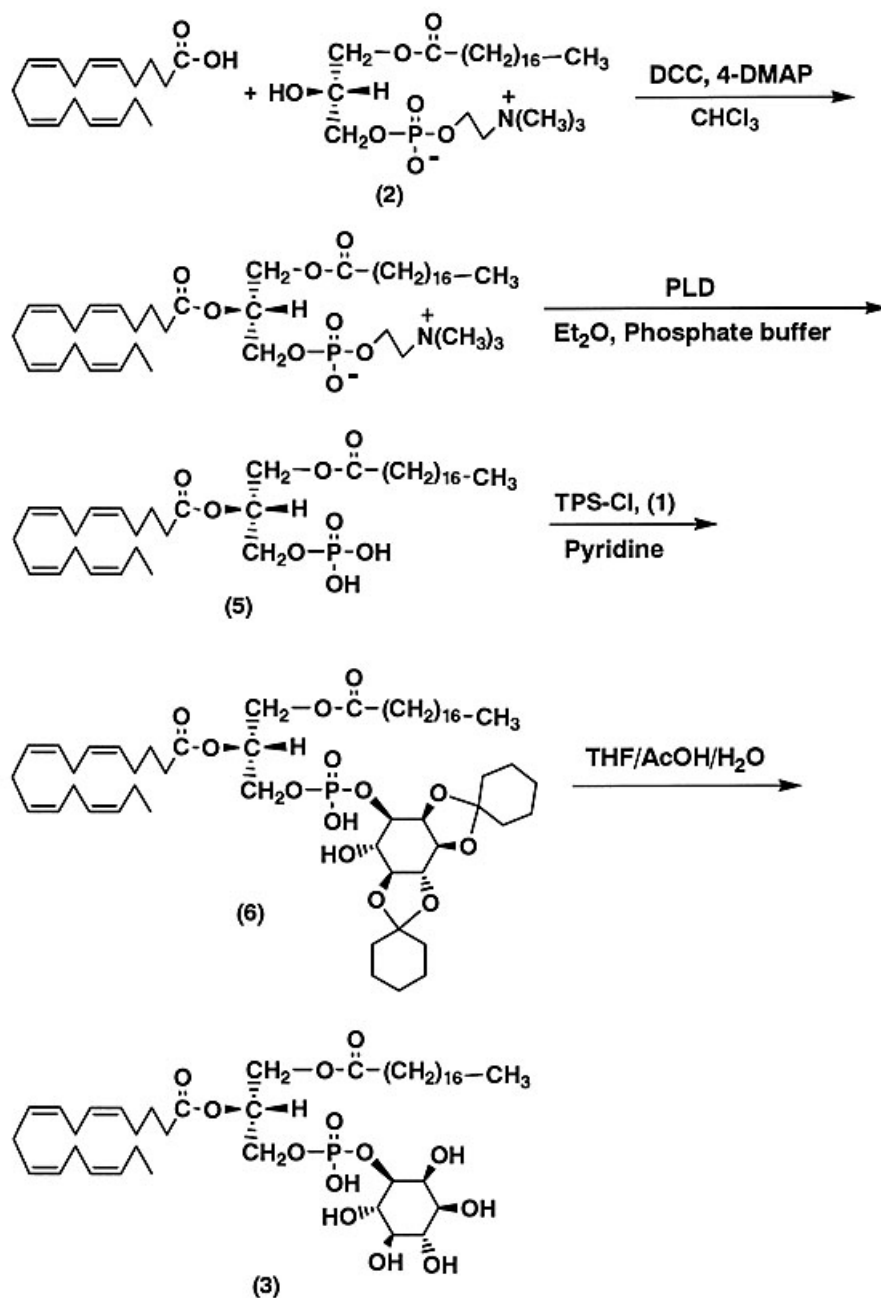
本研究により、PLD, TPS-Cl を用いる事により、これまで行われてきた合成段階よりも少ない段階で2位に多価不飽和脂肪酸を結合するジアシルホスファチジルイノシトールを合成する事が出来た。また、*myo*-イノシトールの水酸基への保護基の導入においても、TPS-Cl を用いる事によって2つあるフリーの水酸基でも一方だけがリン酸基と結合する事が確認された。*myo*-イノシトール誘導体の脱保護においても、3節で述べた反応条件でシクロヘキシリデン基が脱保護された。

この事より、アシル基に別の高度不飽和脂肪酸、或いは過酸化脂肪酸を用いた場合でも、その構造を損なうことなく脱保護が可能であると考えられる。

実験の部

(±)-1, 2:5, 6-di-O-シクロヘキシリデン-*myo*-イノシトール(1)の合成

500ml容丸底フラスコに *myo*-イノシトール(25 g, 139mmol), シクロヘキサノン (250ml, 2.42 mol, ベンゼン (65ml), 及びピリジニウム-*p*-トルエンスルホネート (0.5 g, 2.0mmol) を入れ, Dean-Stark 水分離器を介してジムロート冷却管を取り付け23時



Scheme 3 Synthesis of 1-stearoyl-2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)-icosatetraenoyl]-sn-3-phosphoinositol (3).

間激しく攪拌しながら加熱環流した。反応が進むにつれて、ベンゼンに溶けていなかった粉末 *myo*-イノシトールが溶解していき、反応液が黄色くなっていくので、それを反応の目安とする。23時間後、*myo*-イノシトールがほとんどなくなったところで反応を終了した。この時水が13ml生成した。その後、反応液を綿ろ過し、未反応の *myo*-イノシトールを除去した後、1.5 N-NH₄OH で4回洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、エバポレーターにより減圧濃縮を行った。続

いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/EtOAc= 9/1)により単離精製し、benzene-hexane混合溶媒系で結晶化を行い、(±)-1,2:5,6-di-*O*-シクロヘキシリデン-*myo*-イノシトール(1)(5.12 g, 15.0%)を得た。

TLC (CHCl₃/acetone= 6/1) Rf 0.29

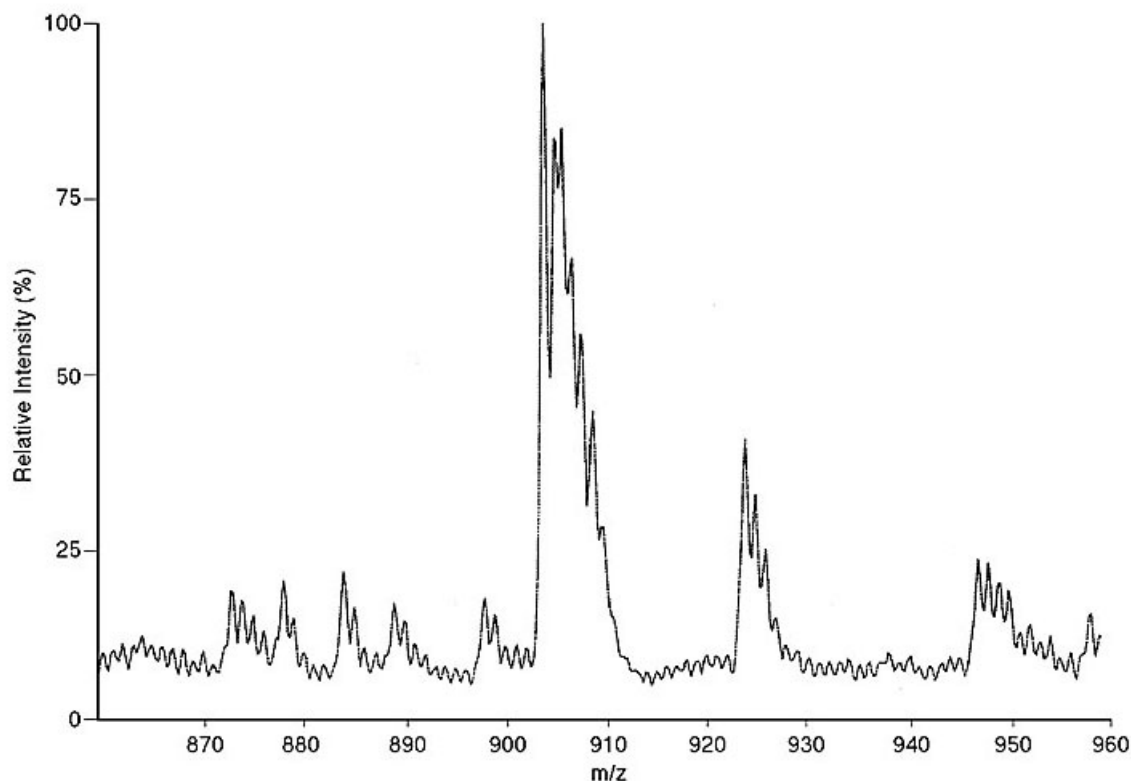


Fig. 1 Ion spray mass spectrum of 1-stearoyl-2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)-icosatetraenoyl]-sn-glycero-3-phosphatidyl-inositol (3) $m/z=904.5$.

1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(4)の合成

25ml容丸底フラスコにエタノールフリークロロホルム(10ml), アラキドン酸(330mg, 1.64 mmol), DCC(600mg, 2.91 mmol), 1-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(2)(250mg, 0.48 mmol)を窒素雰囲気下, BHT 存在下, 暗所で48時間攪拌した. 反応後, セライトろ過を行い, ろ液をエバポレーターにより減圧濃縮を行った. その後, シリカゲルカラム(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=60/30/3)により目的物質 1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(4)(320mg, 0.44 mmol)を得た.

TLC(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=60/30/3) Rf 0.21

1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸(5)の合成

25ml容丸底フラスコに 1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(4)(200mg, 0.25 mmol), 精留ジエチル

エーテル(13.3ml), 0.1M酢酸緩衝溶液(pH5.6), ホスホリパーゼD(0.1mg), BHT を入れ窒素雰囲気下, 30°C, 暗所で48時間攪拌した. 反応後, シリカゲルカラム(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=60/30/10)により単離し, 目的物質 1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸(5)(49mg, 0.04 mmol)を得た.

TLC(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=60/30/10) Rf 0.16

1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジルイノシトール誘導体(6)の合成

10ml容ナスフラスコに 1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸(5)(25ml, 0.035 mmol), 乾燥ピリジン(0.5ml), (±)-1, 2:5, 6-di-O-シクロヘキシリデン-myoinositol(1)(5.82mg, 0.017 mmol), TPS(13.0mg, 4.29 mmol)を窒素雰囲気下, BHT 存在下, 暗所で2時間攪拌した. 続いて等量の蒸留水を入れ, 同条件下で1時間攪拌した. 反応後, ジエチルエーテルで抽出し, 乾燥後, エバポレーター

で減圧濃縮した。その後、シリカゲルカラム(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=80/20/1)で精製し、1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジルイノシトール誘導体(6)(7.9mg, 0.0073mmol)を得た。

TLC(CHCl₃/MeOH/28%NH₄OH=80/20/1) Rf 0.47

1-ステアロイル-2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジルイノシトール(3)の合成

10ml容ナスフラスコに1-ステアロイル 2-[(5'Z, 8'Z, 11'Z, 13'Z)イコサテトラエノイル]-sn-グリセロ-3-ホスファチジルイノシトール誘導体(6)(4.0mg, 0.0036mmol), THF(0.29ml), 酢酸(0.14ml), 蒸留水(0.07ml) (THF/酢酸/H₂O=4/2/1)を入れ, 窒素雰囲気下, BHT 存在下, 暗所で48時間攪拌した。反応終了後, トルエンを少量添加しエバポレーターで共沸した。このものはシリカゲルカラムはせずに IS-MASS に供した。(Fig. 1, m/z=904.5)

要 約

ホスファチジルイノシトールは, 細胞外からのシグナルが細胞膜中の特異的受容体に結合する事により遊離される情報伝達物質の前駆体である。一般にそのグリセロール骨格の sn-2 位には高度不飽和脂肪酸が, 特にアラキドン酸が結合していることが知られている。

本研究では, そのようなアラキドン酸結合ホスファチジルイノシトールの簡便な合成法を酵素的, 化学

的手法を用いる事により位置選択的に合成する事に成功した。

文 献

- 1) Watanabe, Y., T. Nakamura and H. Mitsumoto: Protection of phosphate with the 9-fluorenylmethyl group. Synthesis of unsaturated acyl phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Tetrahedron Letters*, **38**, 7407-7410 (1997)
- 2) Watanabe, Y. and M. Nakatomi: Synthesis of PI (3, 4, 5) P₃ with unsaturated fatty acid chains. *Tetrahedron*, **55**, 9743-9754 (1999)
- 3) Ranganathan, P. and F. Eisenberg Jr.: The inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity. *Biochem. J.*, **235**, 312-322 (1986)
- 4) 海野 均: 平成 8 年度 修士論文 岡山大学
- 5) 米田健司: 平成 2 年度 修士論文 岡山大学
- 6) a) Jacob, T. M. and H. G. Khorana: Studies on polyunsaturateds. XXX. A comparative study of reagents for the synthesis of the C₃'-C₅' internucleotidic linkage. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1630-1635 (1964)
b) Lohrmann, R. and H. G. Khorana: Studies on polynucleotides. LII. The use of 2, 4, 6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride for the synthesis of internucleotide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 829-833 (1966)
c) Alex, T., M. Myer, K. K. Reddy, J. R. Falck, R. Aneja, S. Aneja, A. Parra, D. J. Burns, L. M. Ballas and L. C. Cantley: Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositids PtdIns-3, 4-P₂ and PtdIns-3, 4, 5-P₃. *J. Biol. Chem.*, **51**, 32358-32367 (1994)