

相模湾のクダウミヒドラ *Tubularia* sp. から単離した
免疫抑制活性ステロールの構造と活性

(神奈川大・理) 釜野徳明・五味和枝・張 恵平・小竹文乃・日野晶也
(北陸大・薬) 木津治久
(名古屋大・大学院人間情報) 西川輝昭
(わかもと製薬研究所) 菌部 徹・大村武雄

Structure and Immunosuppressive Activity of Sterols isolated from
The Sagami Gulf Hydrozoa *Tubularia* sp.

Yoshiaki Kamano · Kazue Gomi · Hui-ping Zhang · Ayano Kotake ·
Akiya Hino (Faculty of Sience, Kanagawa University)
Teruaki Nishikawa (Grad. Sch. Human Informatics , Nagoya University)
Haruhisa Kizu (Faculty of Pharmaceutical Science, Hokuriku University)
Thoru Sonobe · Takeo Ohmura (Wakamoto Pharmaceutical Co., Lid.)

Summary

Two immunosuppressive sterols, cholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diol (*trans*-liagosterol) (A) and cholesta-5, 25(26)- diene-3 β , 24 ξ -diol(B) were isolated respectively from the Sagami Gulf Hydrozoa *Tubularia* sp. by the guide of Mitogen bioassey. Structural determination was accomplished mainly by utilizing high-field (400MHz) 2D-NMR experiments, comparing to the spectra of cholesterol. Although these sterols, A and B, were known as the minor components of marine red alga³⁾⁴⁾⁵⁾, the presence in marine animal Hydrozoa such as *Tubularia* sp. was a new discovery.

Sterol A inhibited T lymphocyte proliferation which was induced by plant lectins, concanavalin A (Con-A) and phytochemagglutinin (PHA), more than B lymphocyte proliferation which was induced by lipopolysaccharide (LPS). The activity of sterol B was more week than that of sterol A. On the other hand, by the Mitogen bioassay with hydrocortisone (HC) as a standard inhibitor and related five steroids, β -sitosterol (C), stigmesterol acetate (D), resibufogenin (E), 14,21-epoxy-3 β -hydroxy-5 β -chola-20 (21), 22-dienoic acid (F) and ergosterol (G), the inhibition of sterol A for PHA response was found to be most strong in them. However, for LPS response, the inhibition of hydrocortisone (HC) was more powerful than that of sterol A. Also, the immunosuppressive activity of related steroids, C, D, E and G was little found.

序論

クダウミヒドラ *Tubularia sp.* は、腔腸動物門ヒドラ虫綱に属する海洋付着性動物である。今までに、淡水産腔腸動物ヒドラ *Hydra attenuate* からは頭部形成と出芽を活性化する神経ホルモンが単離されており¹⁾、またヒドラ *Hydra oligactis* からはセロトニンが単離されている²⁾。1990年に神奈川県二宮町の相模湾で、4.75kgのクダウミヒドラを採集し、ウニ受精卵々割阻害作用とヒト肝癌由来細胞に対する殺細胞活性を検討したが、活性はなかった。しかし、マイトゲン (Mitogen) による免疫抑制活性を示すことが分かったので、これを指標としてリンパ球幼若化抑制活性を示す二種のステロールAおよびBを単離し、その構造決定を行った。その結果、ステロールAは、cholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diol (*trans*-liagosterol) であり、ステロールBは、cholesta-5, 25(26)-diene-3 β , 24 ζ -diol であることが分かった (Fig. 1)。いずれも紅藻から既に単離されている³⁾⁴⁾が、クダウミヒドラのような動物から得られたのは最初の例である。また、これらのステロールの 400MHz NMRスペクトルによる¹Hおよび¹³C chemical shift値の帰属は、新しいデータである。さらに、両ステロールがリンパ球幼若化に対して抑制活性 (免疫抑制活性) を有することを見出したのは新しい知見である。このマイトゲンによる免疫抑制活性を、hydrocortisoneを対照に5種のステロイド (β -sitosterol, stigmasterol acetate, resibufogenin, 14, 21-epoxy-3 β -hydroxy-5 β -chola-20(21), 22-dienoic acid, ergosterol) を加えて検討を行った。

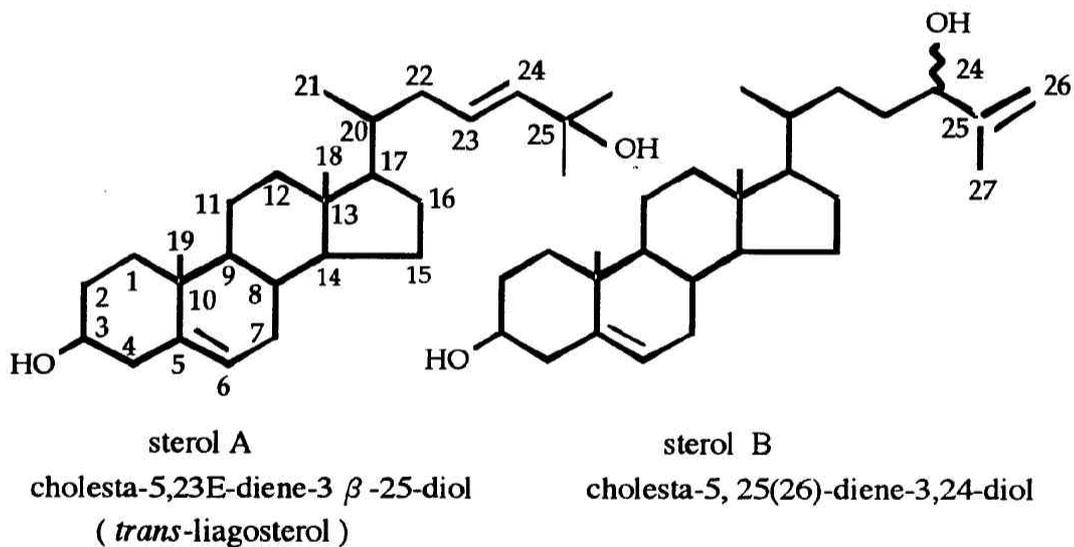


Fig. 1

材料と方法

抽出分離、反応に対する試薬、溶媒は、一級品 (和光純薬工業) を使い、bioassayに使用した試薬、溶媒は、すべて特級品および所定の材料を用いた。単離したステロールAおよびB以外の化合物は、すべて手持ちの標品を用いた。MSスペクトルは、日本電子のJEOL JMS-AX50H MASS SPECTROMETERにより、EIおよびFABMSを測定した。NMRスペクトルは、単離した物質を重クロロホルム $CDCl_3$ に溶解し、内部標準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を用いて、JEOL EX-400装置で測定した。さらに、¹H-¹H COSY、¹³C-¹H COSY、DEPTおよびHMBC実験を行った。

クロマトグラフィー：

薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析には薄層板[ANALTECH社、UNPLATE SILUCAGEL GF (250MICRONS)]を用いて展開後、乾燥させたplateに5%硫酸 (EtOH中) を噴霧120℃で加熱することで発色させた。分取薄層クロマトグラフィー (preparative TLC) は、Whatman社PCK 5F (20×20cm, 100 μm layer)のplateを用いた。カラムクロマトグラフィーは、wetおよびdry法によるオープンシリカゲルクロマトグラフィーを化合物の分離に使用した。展開剤の種類は、Separation Schemeに記載した。溶出には、徐々に極性溶媒を加え、gradientに行い、フラクションコレクター (Advantec SF-2120 Super Fraction Collector) を用いて、各フラクションに分画した。分画物は、上述のTLCによりcheckし、必要なフラクションをまとめた。Sephadex LH-20 (ファルマシア製) を用いる分離は、あらかじめ使用する溶媒中で担体を十分に膨潤させ、airを除いて安定化してから使用した。

生物の採集・抽出・分配：

1990年5月に神奈川県二宮町の砂浜に乾燥してある置網 (定置網) に付着している生物を採集、さらに、その後この網から圧搾機を使って取りさった生物も加え、総量4.75 kgをメタノール抽出 (約1ヶ月をかけ50Lのタルの中で3回抽出) した。以下、Scheme 1に従って操作した。すなわち、抽出液を減圧下で濃縮し、エキスを得、これに再びメタノールを加えて溶解させたものに水を入れ、その比9:1とした。この液を分液ロート中でヘキサンで5回抽出し、ヘキサン可溶部 (28.5g) を得た。メタノール-水の溶液は、水を加えてその比を3:2とし、塩化メチレンでヘキサンと同様に抽出し、塩化メチレン可溶部 (22.0g) を得た。残りのメタノール-水可溶部はそのまま保存した。メタノール抽出物、ヘキサン可溶部、塩化メチレン可溶部およびメタノール-水可溶部のウニ受精卵々割阻害作用とヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5に対する活性を検討したが活性は見られなかった。一方、マイトゲンによるリンパ球幼若化活性を調べたところ、わずかながら塩化メチレン可溶部が免疫抑制活性を示し、以下この活性を手がかりに塩化メチレン可溶部を処理した。

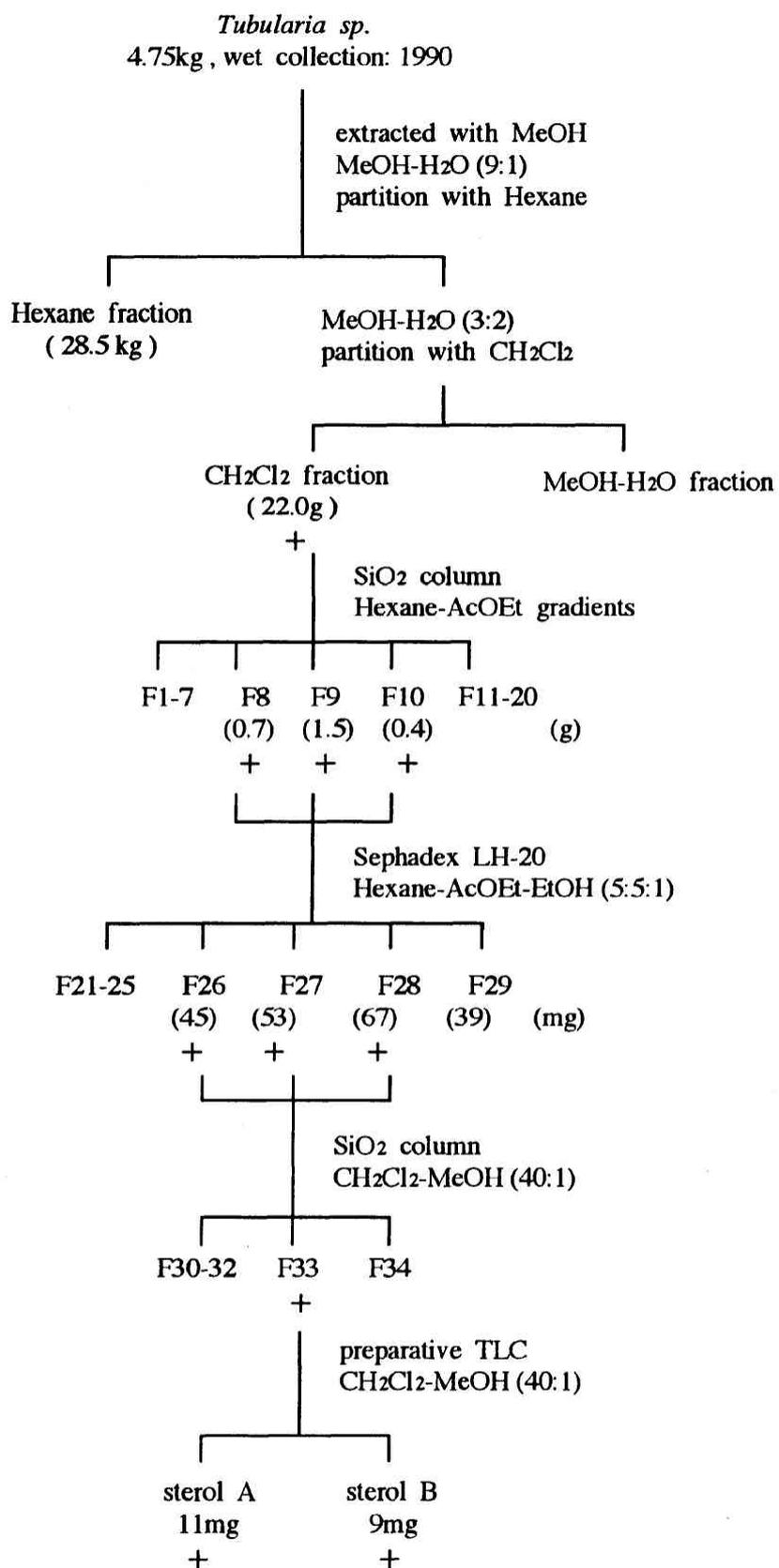
マイトゲンによるリンパ球幼若化抑制活性 (免疫抑制活性)：

Balb/cオスマウス脾臓よりリンパ球を分離し、5%FCSを含むRPMI培地で 1×10^7 個/mlとなるように調整した。96穴マイクロプレートに希釈した検体試料を12wellずつ、各50 μlずつ添加した。次に上記細胞浮遊液を各wellに50 μlずつ添加した。さらに、各2 μg/ml Con-A (concanavalin A)、20 μg/ml PHA (phytohemagglutinin)、5 μg/ml LPS (lipopolysaccharide) およびコントロールとしてPBS緩衝液を各3well (triple cate) ずつ50 μlを加え (total 150 μl)、CO₂インキュベーション内で5%CO₂分圧、37℃で72時間培養した。培養後、MTT法により吸光度を測定し、IC₅₀値を算出した。

結果

単離：

sterol AおよびBの分離図をScheme 1に示す。マイトゲンによる免疫抑制活性を有するCH₂Cl₂可溶部をシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーを行った。F8~F10が活性を示したので、まとめてSephadex LH-20による分画を試みた。得られたフラクションのうち、F26~F28が活性を示し、再び分画した。F33に活性が現われ、そのまま分取薄層クロマトグラフィーに付し、化合物A(11mg)とB(9mg)を得た。UVで検出できず、従っ



Scheme 1

Bioassay: Positive Mitogen activity is indicated in the (+) mark.

て、分取は両端の極一部を硫酸発色させて相当する部分を集めた。いずれもアセトンから無色針状晶として得られた。

構造決定： sterol A : sterol Aの ^1H NMRスペクトルをFig. 2に示す。

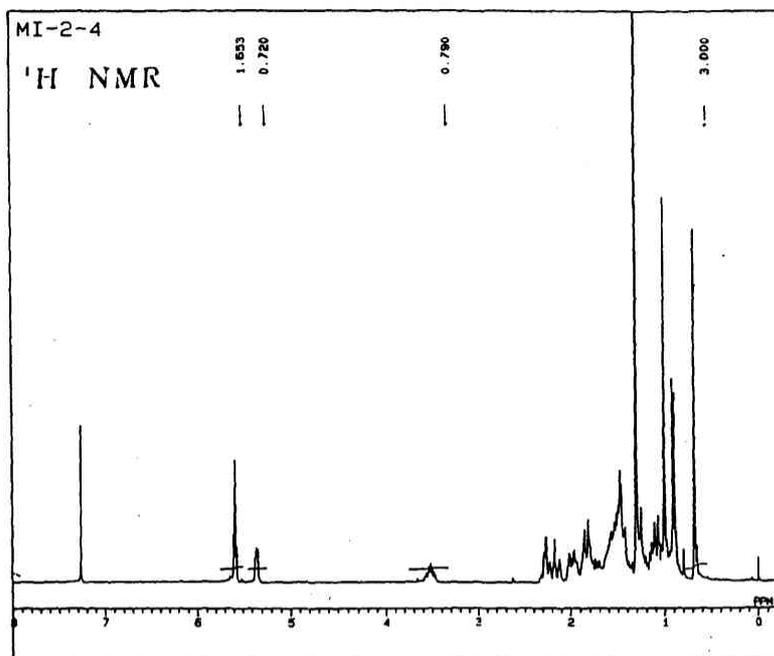


Fig. 2 ^1H NMR spectrum of sterol A

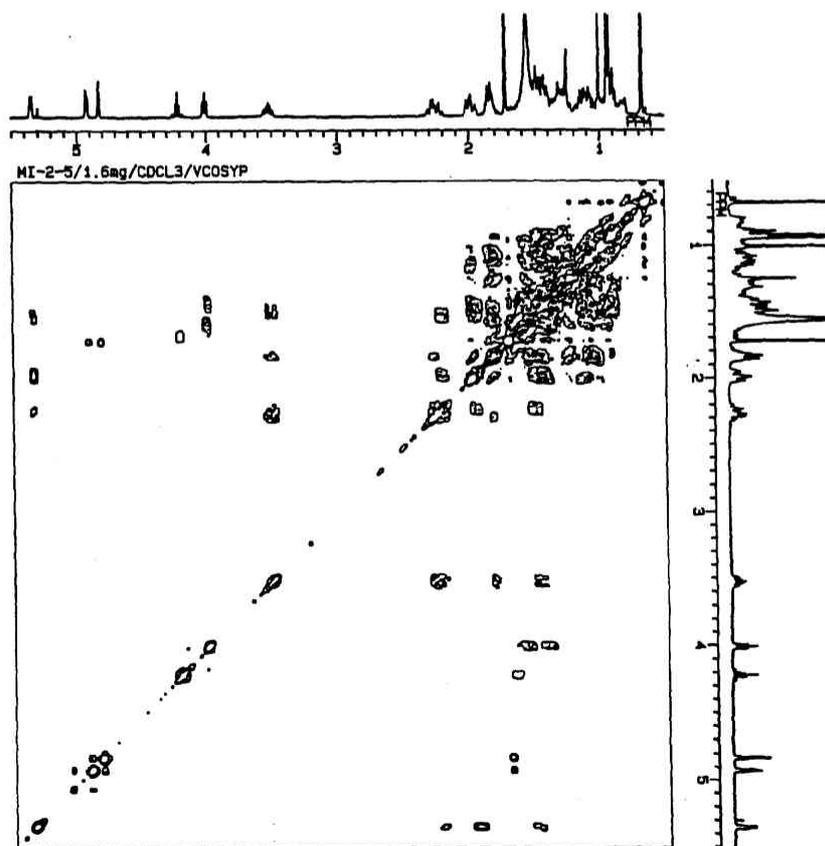


Fig. 3 ^1H - ^1H COSY spectrum of sterol B

sterol Aのこれらのスペクトルデータと、 ^{13}C NMRにおけるDEPT実験から 1) 炭素数 27個、2) メチル基5個、3) 二置換二重結合1個、4) 三置換二重結合1個、オキシメチン(δ_c 71.77、 δ_H 3.52) の存在が示唆され、これらの結果とMSの結果から分子式を $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2$ と決定した。以上の結果からコレスタン骨格を予想し、 ^{13}C NMRスペクトルデータをcholesterolのそれと比較した。Table 1に化合物Aとcholesterolの ^{13}C NMRスペクトルデータを示す。

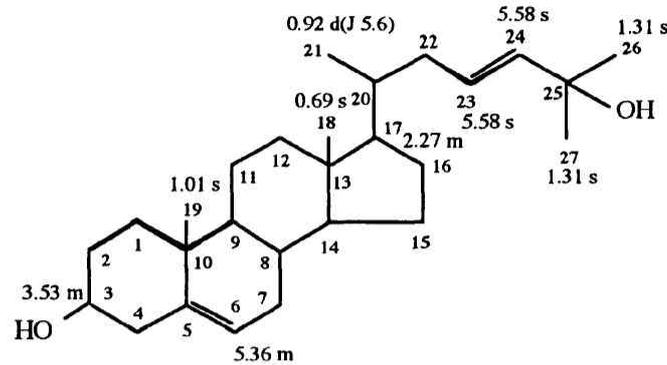
Table 1 ^{13}C Chemical shifts of cholesterol, sterol A and sterol B.

	cholesterol	A		B (ppm)	
1	37.5	37.3	CH ₂	42.3	CH ₂
2	31.6	31.7	CH ₂	31.3	CH ₂
3	71.3	71.8	CH	76.4	CH
4	42.4	42.3	CH ₂	42.3	CH ₂
5	141.2	140.8	C	140.8	C
6	121.3	121.7	CH	110.9	CH
7	32.0	31.9	CH ₂	31.7	CH ₂
8	160.5	31.9	CH	31.4	CH
9	50.5	50.1	CH	50.1	CH
10	36.5	36.5	C	35.6	C
11	21.2	21.2	CH ₂	21.1	CH ₂
12	28.3	28.2	CH ₂	28.2	CH ₂
13	42.4	42.4	C	36.5	C
14	56.9	56.7	CH	56.8	CH
15	24.3	24.3	CH ₂	24.3	CH ₂
16	40.0	39.7	CH ₂	39.8	CH ₂
17	56.5	55.8	CH	55.9	CH
18	12.0	11.9	CH ₃	11.9	CH ₃
19	19.4	19.4	CH ₃	19.4	CH ₃
20	35.8	36.1	CH	31.9	CH
21	18.8	18.7	CH ₃	18.8	CH ₃
22	36.4	38.8	CH ₂	32.3	CH ₂
23	24.1	125.5	CH	31.3-31.9	CH ₂
24	39.6	139.4	CH	76.4(76.8)*	CH
25	28.0	70.7	C	147.5(147.8)*	C
26	22.5	29.9	CH ₃	110.9(111.4)*	CH ₂
27	22.8	29.9	CH ₃	17.6(17.3)*	CH ₃

* The presence of isomer was suggested from these signals.

データの比較から、側鎖部を除きsterol Aはほぼcholesterolに一致していることが分かり、Aは25-OH基を有する Δ^{22} あるいは Δ^{23} 体と推定し、さらにスペクトルを詳細に検討

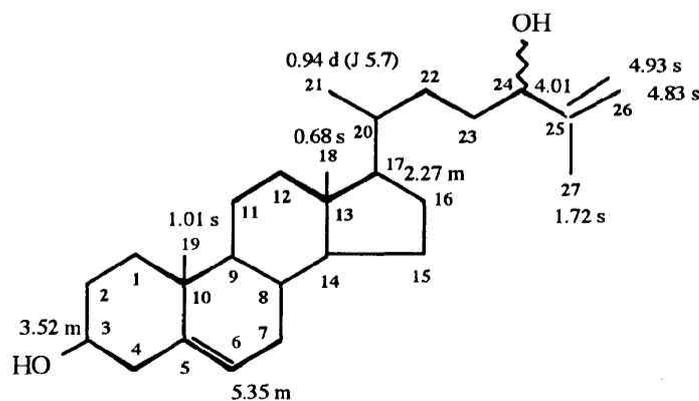
した。 δ c20 36.09と δ c 21 18.67が、cholesterolの値(δ 35.8および18.8)と非常に良く類似しているので、二重結合の位置は23位 (Δ 23)が優位であり、スペクトルデータから *trans*(23E)配置と思われる。以上の結果、sterol Aをcholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diolと決定した。この化合物は既にliagosterolと命名されている^{3),4),5)}。構造をFig. 4に示し、主要な¹H NMRデータを記載した。



sterol A

Fig. 4 cholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diol (*trans*-liagosterol)

sterol B：¹H NMRスペクトルから、sterol BはAの類似化合物であると推定した。主要な¹H NMRデータを構造式 (Fig. 5)に記載した。sterol Bには、スペクトルデータからフタル酸エステルが混在していることが分かった。そこで、不純物以外のsterol Bの¹³C NMRケミカルシフト値をAおよびcholesterolのそれらと比較した。その結果をTable 1に示した。側鎖の23-27位以外はすべてcholesterolの値と同一である。この¹³CスペクトルとMSの結果から分子式C₂₇H₄₄O₂が示唆された。Fig. 3にsterol Bの¹H-¹H COSYスペクトルを示す。sterol BのOH基は、sterol Aと異なり24位と推定される。さらに、二重結合は、exo methylene型であり、その位置を25-26位と推定した。これらの結果、化合物Bの構造をFig. 5に示すcholesta-5,25(26)-diene-3 β ,24 ξ -diolと決定した。¹³C NMRスペクトルにおいて、C-24、C-25、C-26およびC-27位に相当するそれぞれ一対の約1/3のピークが観測され、24位水酸基のisomerの存在が示唆された。従って、化合物Bは、24位水酸基の異性体の混合物であることが分かった。微量なため、分離の検討はしなかった。文献調査の結果、この化合物Bも化合物Aと同じ紅藻から単離されている既知化合物であることが分かった^{3) 4) 5)}。



sterol B

Fig.5 cholesta-5, 25-(26)-diene-3 β , 24 ξ -diol

生物活性：

sterol A (cholesta-5,23E-diene-3 β ,25-diol: liagosterol)とsterol B (cholesta-5,25(26)-diene-3 β ,24 ξ -diol)のウニ受精卵々割阻害作用を検討したが、いずれも活性は見られなかった。sterol AとBがマイトゲンによるリンパ球幼若化抑制活性を示すことが分かり、hydrocortison (HC)を対照に手持ちの5種のステロイド： β -sitosterol (C), stigmasterol acetate (D), resibufogenin (E), 14, 21-epoxy-3 β -hydroxy-5 β -chola-20 (21), 22-dienoic acid (F)およびergosterol (G)についても同時に活性を測定した。その結果をTable 2に要約し、各化合物の構造をFig. 6に示した。

Table 2 マイトゲンによるリンパ球幼若化抑制活性 (IC₅₀)

compounds	Buffer	PHA	Con-A	LPS(ng/ml)
A	705	100	56	115
B	>1000	200	235	300
C	>1000	>1000	>1000	500
D	>1000	>1000	>1000	1000
E	>1000	>1000	>10000	660
F	>1000	>1000	>1000	630
G	>1000	>1000	>1000	620
HC	9	180	12	16

A: cholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diol (化合物A)

B: cholesta-5, 25 (26)-diene-3 β , 24 ξ -diol (化合物B)

化合物AとBはいずれもマイトゲンによる免疫抑制活性を示し、しかも化合物Aは、phytohemagglutinin (PHA)で処理したリンパ球に対して、hydrocortisoneよりも強い阻害作用を示した。しかし、Con-AおよびLPSに対しては、sterol Aの免疫抑制活性は、それぞれhydrocortisoneの活性の約1/5および1/7程度であった。化合物AとBとの比較では、Aの方が全体的に強い。また、他のステロイドについても植物ステロールであるstigmasterolの3-acetate (D)を除く全てに、LPSに対して多少活性があるように思われ、興味深い。Fig. 6に示すように、これらのステロイドの側鎖は、化合物AおよびBと違っており、化合物AおよびBの側鎖構造が活性に影響を与えているものと思われる。sterol Aの免疫抑制活性はT細胞に対して選択的であるように思われる。

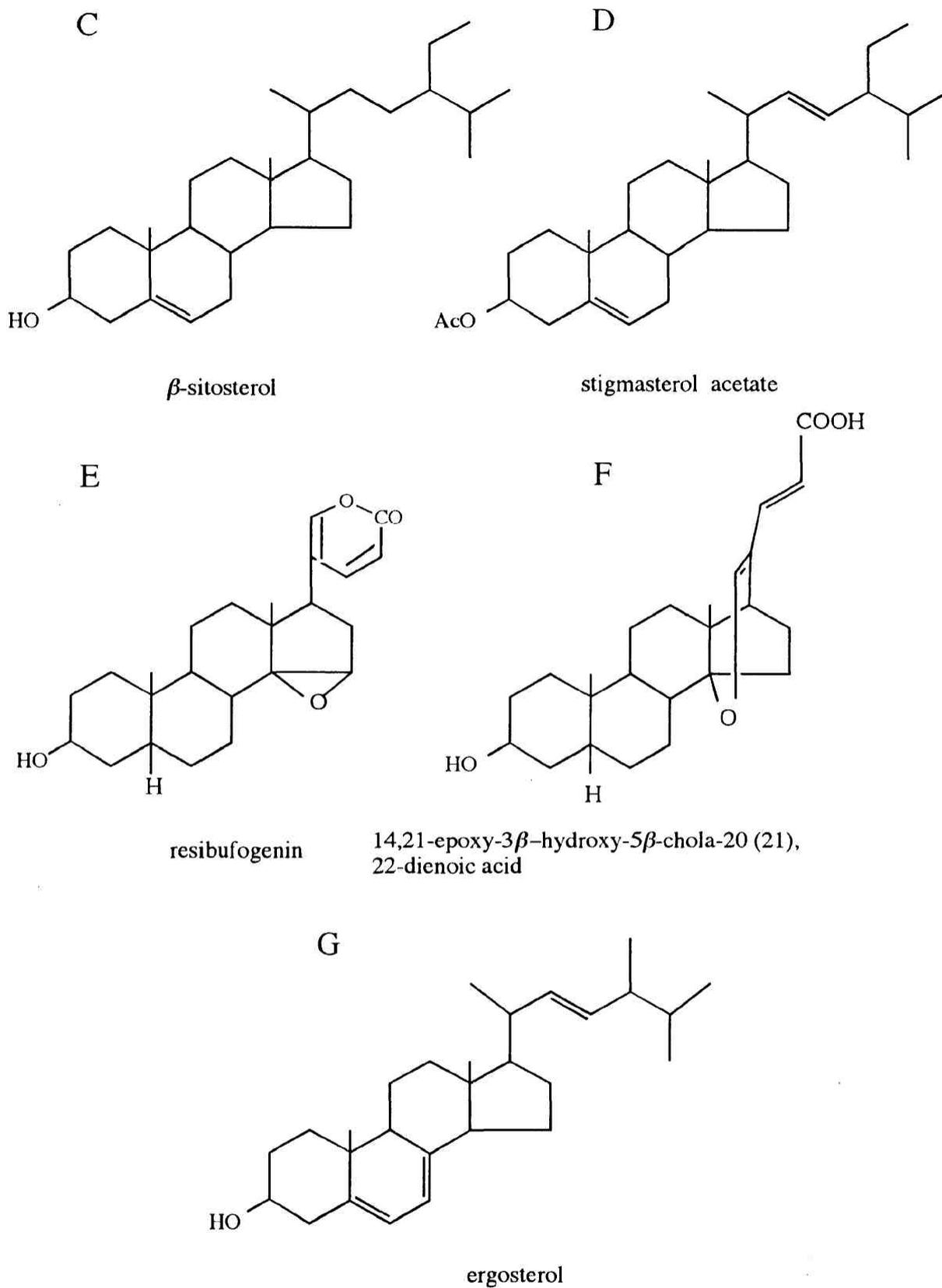


Fig. 6 Structure of steroids

考察

相模湾のクダウミヒドラ *Tubularia* sp. から免疫抑制活性を持つ sterol A および B を単離し、それぞれ構造を既知の紅藻ステロール cholesta-5, 23E-diene-3 β , 25-diol (*trans*-liagosterol) および cholesta-5, 25(26)-diene-3 β , 24 ζ -diol (sterol B) と決定した。また、マイトゲンによるリンパ球幼若化抑制作用を検討し、両化合物とも免疫抑制活性を有し、sterol A は B より強いことが分かった。その活性の程度は、Con-A と LPS に対しては、hydrocortisone より弱いものであったが、concanavalin A による反応に対して sterol A が特異的に阻害を示した点興味を持たれる。さらに、sterol A、B の免疫抑制活性は無添加 (buffer) に対してあまり影響を与えず、LPS 反応に対しての阻害は弱く、PHA と特に Con-A 反応を強く阻害したことから、T 細胞に対して選択的に作用する化合物であると思われる。同時に検討したステロイド 5 種の側鎖の構造から考察すると、sterol A の側鎖構造が活性発現に重要であると考えられる。

両化合物 A、B とも、既知化合物であるが、紅藻ではない動物から得られたのは初めてであり、生合成的にも意義深い。すなわち、紅藻の中でも、sterol A (liagosterol) が含まれているのは、ウミゾウメン目 *Nemalionales* の *Liagora distenta* (*Helminthocadiaceae*) と *Scinaia furecellata* (Turn.) Bivona (*Chaetangiaceae*) に限られ³⁾、またグルス目 *Rhodymeniales* の中の *Rhodymenie palmate* に sterol A と B が極微量に含有しているに過ぎない⁴⁾⁵⁾。これらの sterol については、desmosterol から光酸化反応あるいは類似の方法で生合成されたのと考えられている⁵⁾。一方、本研究のクダウミヒドラからは、かなりの量の sterol A と B が単離されており、今後 desmosterol の検索をする必要がある。

文献

- 1) Schaller, H. C. : *Colloq. Inten. C. N. R. S.* No. 251, 33-38 (1976).
- 2) Pujol, J. P. : *Bull. Soc. Limm. Normand.* 9, 158 (1968).
- 3) E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce, and C. Sica, *phytochemistry*, 14, 1579 (1975).
- 4) C. Loriaux, M. Morisakki, and N. Ikekawa, *phytochemistry*, 15, 723 (1976).
- 5) M. Morisaki, S. Kidooka, and N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 3214 (1976).