[農化 第35巻, 第3号, p. 200~206, 1961]

微生物によるステロイドの転換反応 (第9報)*

Alternaria bataticola による Δ^4 -3-ケトステロイドの還元

白坂 亮, 尾崎 雅子 (三共株式会社高峰研究所)

昭和35年8月23日受理

前報までに報告して来た微生物によるステロイドの酸化反応は極めて多く見出され、且つ研究されて来ている反応であるが、微生物特にかび類によるステロイドの還元反応については現在まで余り研究されていない。この還元反応については古くは細菌や酵母による性ホルモン系ステロイド (C-19 ステロイド) の還元⁽¹⁾が報告されているが、その後1952年 Peterson⁽²⁾ や Perlman⁽³⁾ らにより progesterone の微生物酸化の際に、極めて僅かの Δ^4 の還元された飽和ステロイドがえられたことが報告されている。又同じ頃 Camerino⁽⁴⁾ らは酵母を用いて 11-位に酸素を有する pregnane 系ステロイドの 3-位の還元を述べている。この場合、この酵母による還元は Δ^4 が飽和され、且つ 11-位に酸素を有するステロイドに対してのみ行われるものである。ところで著者はかび類によるステロイドの転換反応性についての菌の検索において *Alternaria bataticola* が一般の pregnene 系ステロイドの Δ^4 及び 3-ケトンを一様に還元することを見出し、この菌を各種のステロイドに作用せしめた結果、これらのステロイドの Δ^4 を還元して、一様に pregnane (β -配位) を生成し、更に 3-ケトンを還元することを認めた。しかもこの 3-ケトンの還元においてステロイド核の 11-位に酸素を有していないステロイドの場合は 3α -及び 3β -hydroxy 体の両 isomer を与えるのに対し、11-位に酸素を有しているステロイドの場合は 3α -hydroxy 体のみを与えることを知った。このことは本菌の還元反応における極めて高度の立体化学的特異性を示すものであり、甚だ興味あることである。以下これらの結果について述べる。

実 験 方 法

培養及び生成物の抽出法 ペプトン 1%, NaNO_3 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, potato starch 1.5% 及び potato decoction 2.2% よりなる培地 10l を 500 cc 容振盪フラスコ 100 本に 100 cc 宛分注し、15lb にて 25 分間殺菌後、冷却し、各フラスコに *Alternaria bataticola* の同培地での 48 時間培養菌体を約 5cc 宛接種し、26° にて 48 時間振盪培養後、ステロイドの 2.5% メタノール溶液を各フラスコに 2cc 宛添加し、更に 48~72 時間同様に培養をつづける。培養終了後この醗酵液を菌体と濾液とに分け、濾液を 8l の醋酸エチルにて 2 回抽出し、減圧濃縮後、この濃縮液を 2% 重曹水及び水にてそれぞれ 2 回宛洗滌し、芒硝にて脱水後再び濃縮する。この濃縮残渣は次の如きカラムクロマトグラフにかけて、それぞれの還元生成物を単離精製する。

ペーパークロマトグラフィとカラムクロマトグラフィ 還元生成ステロイドの検出には Zaffaroni 法の改良法によるペーパークロマトグラフィを用いて行なった。すなわち濾紙の固定液としてプロピレングリコール-メタノール (1:2) の混合液を用い、移動液 (展開液) としてトルオール-ジオキサン (78:22) の混合液を用い下降法にて行なった。スポットの検出は紫外線の照射による吸収及び 2,4-dinitrophenylhydrazine 又は triphenyltetrazolium chloride (TPTZ) による呈色によって行なった。

又ステロイドの分離はアルミナ又は Florisil を用いたカラムクロマトグラフィーを用いて行なった。まずアルミナの場合上述の濃縮残渣を 150cc のベンゼンにとかし、100g のアルミナを用いたカラムに添加し、次いでベンゼン、ベンゼン-エーテル (95:5), (90:10), (50:5); エーテル, エーテル-クロロホルム (95:5), (90:10), (50:50); クロロホルム, クロロホルム-アセトン (95:5), (90:10), (50:50), アセトン等の各混合溶媒それぞれ 150cc にて 2 回ずつ溶出し、各溶出部を濃縮し、それぞれについてペーパークロマトグラフィにて検定の後、同一物質溶出部をそれぞれ合してアセトン又はメタノールにて再結する。又 Florisil の場合は濃縮残渣を 100cc のエチレンジクロライドにとかし、100g の Florisil を用いたカラムに添加し、エチレンジクロライ

* Microbiological Transformation of Steroid. Part IX. Reduction of Δ^4 -3-Ketone Steroid by *Alternaria bataticola*.

By Makoto SHIRASAKA and Masako OZAKI (Takamine Laboratory, Sankyo Co., Ltd.)

第8報は Chem. Pharm. Bull., Japan. 投稿中。

ド, エチレンジクロライド-アセトン (25:1), (15:1), (12:1), (10:1), (8:1), (5:1), (3:1) 及び (1:1) の各比混合溶媒それぞれ 100 cc にて 2 回宛溶出する. 以下はアルミナの場合と同様に操作して, それぞれのステロイドを単離精製する.

実 験 結 果

(1) **Progesterone** の微生物還元 上述の如く progesterone を基質として *Alternaria bataticola* を培養し抽出すると, このものはペーパークロマトグラフィ (PC) にて progesterone よりも極性の小さい 1 個のスポットと極性の異なる 2 個のスポットがみとめられた. したがってこの抽出濃縮物を上述の如くアルミナカラムにて分離すると, 第 1 の溶出部から上述の如くしてアセトンより結晶せしめて pregnane-3, 20-dione (I) の結晶をえた. 次に第 2 の溶出部から同様にして 3 α -hydroxy-pregnane-20-one の結晶 (II) をえた. 更に最後の溶出部から同様にして 3 β -hydroxy-pregnane-20-one (III) の結晶をえた.

これらの結晶はそれぞれ次の如き恒数及び赤外吸収を示した. すなわち (I) は m. p. 120~122°, $[\alpha]_D +124^\circ$ (CHCl₃), 元素分析の計算値, C₂₁H₃₂O₂: C 79.70, H 10.19. 実験値: C 79.22, H 10.41%. 紫外外部吸収最大値なし, 赤外吸収 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 1725 (3,20-CO) cm⁻¹ であり, (II) は m. p. 142°, $[\alpha]_D +96^\circ$ (MeOH), 元素分析の計算値, C₂₁H₃₄O₂: C 79.19, H 10.76. 実験値: C 79.36, H 10.28%. 紫外外部吸収最大なし, 赤外吸収 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3350 (OH), 1700 (20-CO) cm⁻¹ であり, (III) は m. p. 188~192°, $[\alpha]_D +90^\circ$ (MeOH), 計算値, C₂₁H₃₄O₂: C 79.19, H 10.76. 実験値: C 80.18, H 10.89%. 紫外外部吸収最大なしであった.

これらは何れも元素分析の結果酸素の増減はなく, しかも紫外外部吸収の最大値が認められず, 赤外吸収にて二重結合 (Δ^4) の吸収が消失していることから, これらは何れも Δ^4 が飽和されたものと考えられる. (I) の恒数及び赤外吸収スペクトルは pregnane-3, 20-dione^(6,12) のそれらに一致した.

(II) は赤外吸収にて OH 基の吸収を示し, しかも 3 α -hydroxy-pregnane-20-one の恒数⁽⁵⁾及び赤外吸収スペクトル⁽¹²⁾に一致した. 次に (III) は 3 β -hydroxy-pregnane-20-one の恒数⁽⁵⁾に一致し, このものを無酢及びピリジンにて常法の如くして得られた monoacetate (m. p. 140~144°) の赤外吸収スペクトルは 3 β -acetoxy-pregnane-20-one⁽¹²⁾ のそれに一致した. 以上の結果から本菌は progesterone に対してその Δ^4 を β -位 (pregnane) に還元し, 更に 3-ケトン を α - 及び β - の両 isomer に還元することが認められた.

(2) **Deoxycorticosterone** の微生物的還元 Deoxycorticosterone (DOC) を基質として上述の如く本菌を培養し抽出すると, このものは PC にて DOC よりも極性の小さい 1 個のスポットと, 極性の大きい 2 個のスポットを示した. この抽出濃縮物 (6.3 g) を常法の如く Florisil カラムにて分離すると, 最初の溶出部から非結晶性のステロイド (IV_a) がえられた. したがってこのものを無酢及びピリジンにて常法の如くアセチル化すると, m. p. 145~150° の結晶 (IV_b) が得られた. このものは $[\alpha]_D +100^\circ$ (CHCl₃), 元素分析計算値, C₂₃H₃₄O₄: C 73.36, H 9.15. 実験値: C 73.11, H 9.20%. 赤外吸収 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 1755 (AcO-CO), 1715 (3,20-CO) cm⁻¹ を示し, 且つ紫外外部吸収最大値を示さなかった. したがって (IV_b) の Δ^4 は飽和されていると考えられる. これらの恒数及び赤外吸収スペクトルは 21-acetoxy-pregnane-3,20-dione^(6,12) のそれらに一致した. 次に第 2 の溶出部から同様にして m. p. 139~145° の結晶 (V) をえた. このものは元素分析計算値, C₂₁H₃₄O₃: C 75.40, H 10.25. 実験値: C 75.22, H 9.89%. 赤外吸収 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3430 (OH), 1710 (20-CO) cm⁻¹ を示し, 紫外外部吸収の最大値を示さなかった. したがって (V) も Δ^4 が飽和されたものである. (V) の赤外吸収スペクトルは 3 α , 21-dihydroxy-pregnane-20-one⁽¹²⁾ のそれに一致した. 最後の溶出部からは同様に処理して非結晶性物質 (VI_a) しかえられなかったで, 上述の如くアセチル化し, アセテートとしての結晶 (IV_b) をえた. このものは m. p. 99~107°, $[\alpha]_D +85^\circ$ (acetone), 元素分析計算値, C₂₅H₃₈O₆: C 71.74, H 9.15%. 実験値: C 72.01, H 9.26% を示し, 紫外外部吸収の最大を示さなかった. したがって (VI) は Δ^4 が飽和されたものである. (VI_b) のこれらの恒数は 3 β , 21-diacetoxy-pregnane-20-one^(7,8) の恒数に一致した. これらの結果より deoxycorticosterone の場合も, 本菌は先の progesterone の場合と同様にその Δ^4 を β -位に還元し, 更にその 3 α - 及び 3 β -hydroxy 体の還元体を与える.

(3) **Reichstein's Compound S** の微生物的還元 Compound S を基質として常法の如く本菌を作用せしめ, 抽出濃縮物 6.6 g をえた. このものは PC にて compound S よりも極性の小なるスポット 1 個と極性の異なるスポット 2 個とを示した. これを上述の如く Florisil カラムにて分離すると, まず初めの溶出部から常法の

如くして m.p. 186~191° の結晶(VII)がえられた. このものは $[\alpha]_D + 60^\circ$ (EtOH), 元素分析計算値, $C_{21}H_{32}O_4$: C 72.38, H 9.26%. 実験値 C 72.71, H 9.18% を示し, 紫外外部吸収の最大値を示さなかった. したがって, (VII) は Δ^4 が還元されたものである. 又赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3450 (OH), 1710 (3,20-CO) cm^{-1} を示した. 次にこの結晶(VII)を無醋及びピリジンにて常法の如くアセチル化すると, 21-monoacetate がえられた. このものは m.p. 186~191°, $[\alpha]_D + 60^\circ$ (EtOH), 元素分析計算値, $C_{23}H_{34}O_5$: C 70.74, H 8.78%. 実験値: C 70.87, H 8.66%, 赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3450 (OH), 1760 (AcO-CO), 1720 (3-CO) cm^{-1} を示し, 且つ紫外外部吸収の最大値を示さなかった. これらの恒数は 21-acetoxy-17 α -hydroxy-pregnane-3,20-dione⁽⁹⁾ の恒数に一致した. 次に第2の溶出部から常法の如くして m.p. 203~205° の結晶(VIII)がえられた. このものは $[\alpha]_D + 62^\circ$ (MeOH), 元素分析, 計算値 $C_{21}H_{34}O_4$: C 71.96, H 9.78%. 実験値: C 72.10, H 9.87%, 及び赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3400 (OH), 1715 (20-CO) cm^{-1} を示し, 紫外外部吸収の最大値を示さなかった. したがって (VIII) は Δ^4 が飽和されているとみなされる. これらの恒数は 3 α , 17 α , 21-trihydroxypregnane-20-one⁽¹⁰⁾ の恒数に一致した. 次に(VIII)を無醋及びピリジンにて常法の如くアセチル化すると diacetate がえられた. このものは m.p. 198~201°, $[\alpha]_D + 82.5^\circ$ (MeOH), 元素分析, 計算値, $C_{25}H_{38}O_6$: C 69.09, H 8.81%, 実験値: C 69.21, H 8.86%. 赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3450 (OH), 1740 (AcO-CO), 1720 (20-CO) cm^{-1} を示した. しかもこれらの恒数並びに赤外吸収スペクトルは 3 α , 21-diacetoxy-17 α -hydroxypregnane-20-one^(10,12) の恒数及び赤外吸収に一致した. 更に最後の溶出部から同様にして m.p. 215~225° の結晶(IX)がえられた. このものは $[\alpha]_D + 48^\circ$ (EtOH), 元素分析, 計算値, $C_{21}H_{34}O_4$: C 71.96, H 9.78%, 実験値: C 72.11, H 9.62%. 赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3400 (OH), 1710 (20-CO) cm^{-1} を示し, 紫外外部吸収の最大値を示さなかった. したがって (IX) は二重結合(Δ^4)が飽和されたものとみなされる. これらの恒数は 3 β , 17 α , 21-trihydroxypregnane-20-one の恒数⁽¹⁰⁾に一致する. 次にこのものを無醋及びピリジンにてアセチル化すると diacetate がえられた. このものは m.p. 148~150°, $[\alpha]_D + 44^\circ$ (EtOH), 元素分析, 計算値 $C_{25}H_{38}O_6$: C 69.09, H 8.81%. 実験値: C 68.92, H 8.66%. 赤外吸収 $\nu_{\max}^{KBr}$: 3450 (OH), 1740-1720 (AcO-CO, 20-CO) cm^{-1} を示した. これらの恒数並びに赤外吸収スペクトルは 3 β , 21-diacetoxy-17 α -hydroxypregnane-20-one の恒数⁽⁹⁾並びに赤外吸収⁽¹²⁾に一致した.

以上の結果から, 本菌は compound S に対しても同様にその Δ^4 を β -位に還元し, 更に 3-ケトン を 3 α - 並びに 3 β -位にそれぞれ還元することが判った.

次に Δ^4 及び 3-ケトンの一連の還元反応の順序を検討する意味で, 17 α , 21-dihydroxypregnane-3,20-dione (VII) を基質として, 常法の如く本菌を培養し, その抽出物を PC にて検出した結果, それぞれ (VIII) 及び (IX) のスポットが認められた. したがってこの結果から本菌のこれらの一連の還元反応においては, まず Δ^4 の還元が行なわれ, 次いで 3-ケトンの還元が行われるものと解される.

(4) **Corticosterone の微生物還元** Corticosterone を基質として常法の如く本菌を培養し、その抽出濃縮物を PC にて検出すると、corticosterone よりも極性の小なるスポット 1 個と大なるスポット 1 個とが認められた。次いでこの抽出濃縮物を上述の Florisil カラムクロマトグラフにかけて、最初の溶出部からえられた非結晶性ステロイド (X_a) を常法の如く無醋及びピリジンにてアセチル化して、アセテートとしての結晶 (X_b) をえた。このものは m.p. 153~155°, $[\alpha]_D +128^\circ$ (acetone) を示し、紫外部吸収の最大値がなく、且つ赤外吸収スペクトルは $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3480 (OH), 1750 (AcO-CO), 1727 (3-CO) cm^{-1} を示した。又このものの分析値は、計算値, $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_5$: C 70.74, H 8.78%. 実験値: C 70.53, H 8.50% であった。これらのことから (X_b) は Δ^4 が飽和され、二重結合が消失されたと考えられる。このものの赤外吸収スペクトルは 21-acetoxy-11 β -hydroxypregnane-3, 20-dione⁽¹²⁾ のそれに一致した。次に第 2 の溶出部を濃縮し、アセトンから再結を行なって m. p. 196~197° の結晶 (XI) をえた。このものは $[\alpha]_D +88^\circ$ (CHCl_3) を示し、紫外部吸収の最大値はなく、赤外吸収スペクトルは $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3430 (OH), 1710 (20-CO) cm^{-1} を示し、且つ元素分析は計算値, $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$: C 71.96, H 9.78%. 実験値: C 72.05, H 9.78% を示した。これらのことから (XI) も Δ^4 が還元され、且つ PC にて (X) よりも極性が大なることから、一つのケトン基 (3- 又は 20-ケトン) が還元されて OH 基を型成したと考えられる。なお、この赤外吸収スペクトルは 3 α , 21-dihydroxypregnane-20-one⁽¹²⁾ のそれに一致した。以上の結果から本菌は corticosterone からは 3-ケトンの還元物としては 3 α -hydroxy 体の一つの isomer しか与えないことになる。

(5) **Cortisone の微生物還元** 次に cortisone を基質として、上述の如く本菌を培養抽出すると、その抽出物の PC は cortisone よりも極性の小なる 1 個のスポットと極性の大なる 1 個のスポットのみを示した。次いで常法の如くこの抽出濃縮物を Florisil カラムクロマトグラフにて分離を行うと、最初の溶出部からこの溶媒を飛ばし、アセトン-エーテルにて再結して、m.p. 214~217° の結晶 (XII) をえた。このものは $[\alpha]_D + 92^\circ$ (MeOH) を示し、紫外外部吸収の最大値がなく、赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3530 (OH), 1700 (3, 11, 20-CO) cm^{-1} を示した。又元素分析は計算値, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$: C 69.58, H 8.34%。実験値: C 68.33, H 7.89% であった。紫外外部吸収の結果及び赤外吸収スペクトルによる Δ^4 の消失から、このものは Δ^4 が還元されたものと見なされる。次にこのものを無酢及びピリジンにて常法の如くアセチル化すると 21-monoacetate が得られた。このものは m.p. 221°, $[\alpha]_D + 72^\circ$ (acetone) を示し、分析結果は計算値, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$: C 68.29, H 7.97%。実験値: C 68.65, H 8.21% であり、赤外吸収スペクトルは $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3450 (OH), 1720-1700 (21-acetoxy, 20, 11-CO), 1230 (21-acetoxy) cm^{-1} を示した。これらの恒数及び赤外吸収スペクトルは 21-acetoxy-17 α -hydroxypregnane-3, 11, 20-trione^(11, 12) のそれぞれに一致した。したがって (XII) は cortisone の Δ^4 が還元されたものである。次に第 2 の溶出部を常法の如く処理して結晶せしめると、m.p. 188~191° の結晶 (XIII) がえられた。このものは $[\alpha]_D + 60^\circ$ (acetone) を示し、紫外外部吸収の最大値を示さず赤外吸収スペクトルは $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3500 (OH), 1700 (20-CO) を示した。元素分析の結果は計算値, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$: C 69.20, H 8.85%。実験値: C 69.66, H 8.32% であった。次にこの結晶を無酢及びピリジンにて常法の如くアセチル化すると diacetate がえられた。このものは m.p. 227~231°, $[\alpha]_D + 95^\circ$ (CHCl_3), 赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 3400 (OH), 1740-1720 (3, 20AcO) cm^{-1} を示し、元素分析結果は計算値, $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$: C 66.94, H 8.09%。実験値: C 67.20, H 8.18% であった。これらの恒数及び赤外吸収スペクトルは 3 α , 21-diacetoxy-17 α -hydroxypregnane-11, 20-dione^(11, 12) のそれらに一致した。したがって, (XIII) は cortisone の Δ^4 が還元され、且つ 3-ケトンが 3 α -位に還元されたものである。以上の結果から cortisone は本菌により Δ^4 及び 3-ケトンが還元され、しかも 3-ケトンの還元においては 3 α -位にのみ還元されるものと

第1図 11 α -, 17 α -Hydroxyprogesterone 及び hydrocortisone より還元生成ステロイドのペーパークロマトグラフ

[I] 11 α -Hydroxyprogesterone を基質とした場合

[II] 17 α -Hydroxyprogesterone を基質とした場合

[III] Hydrocortisone を基質とした場合
スポット S: 各基質ステロイドのスポット位置
スポットの検出: [I] [II] は 2,4-dinitrophenylhydrazine, [III] は TPTZ にて行った。

3 α -hydroxy 体)のみを与え, 17 α -hydroxyprogesterone からはその pregnane 体及び 3 α -並びに 3 β -hydroxy 体の両 isomer を与えるものと考えられる。

考えられる。この結果は先の corticosterone の場合と同じである。

このことは今まで行なって来た先の3種の基質ステロイドの本菌による3-ケトンの還元の場合と、後の corticosterone 及びこの cortisone の場合とでは、明らかな差異があることを示すものである。すなわち前者からは本菌により 3 α -及び 3 β -hydroxy 体の両 isomer がえられるに対し、後の corticosterone 及び cortisone からは何れも 3 α -hydroxy 体の一つの isomer のみしかえられないことになる。これらの違いを更に検討するために、次に他のステロイドについて本菌による還元生成物の検討を PC にて行なってみた。

(6) 他の基質ステロイドの微生物還元 最後に 11 α -hydroxyprogesterone, 17 α -hydroxyprogesterone 及び hydrocortisone を基質とし、培地 20 cc, 基質ステロイドそれぞれ 10 mg を用いて常法の如く本菌を培養し、培養液を醋酸エチルにて抽出濃縮し、これらをそれぞれ PC にて検出したが、その結果は第1図の如くであった。

すなわち 11 α -hydroxyprogesterone (I) 及び hydrocortisone (III) の場合、極性の大きなスポットは何れも (B) の1個のみであり、これに反し 17 α -hydroxyprogesterone (II) の場合は極性の大きなスポットは (B) 及び (C) の2個を示している。これらのスポットの内スポット (A) はそれぞれの pregnane 体と考えられ、(B) 及び (C) はそれぞれの 3 α -hydroxy 及び 3 β -hydroxy 体とみなされる。したがって 11 α -hydroxyprogesterone 及び hydrocortisone からは、本菌はそれぞれの pregnane 体及び 3-hydroxy 体の1個の isomer (多分

考 察

以上の如く *Alternaria bataticola* を各種の基質ステロイドに作用せしめて、それぞれの Δ^4 及び 3-ケトンの還元生成物をえたが、その結果を総括すると第 1 表の如くなる。

第 1 表 *Alternaria bataticola* による各種ステロイドの Δ^4 及び 3-ケトン還元物の生成

基質ステロイド	還元生成ステロイド		
	3-ケトプレグナン	3 α -ヒドロキシプレグナン	3 β -ヒドロキシプレグナン
Progesterone	+	+	+
Deoxycorticosterone	+	+	+
Reichstein's Comp. S	+	+	+
Corticosterone	+	+	—
Cortisone	+	+	—
11 α -Hydroxyprogesterone	(+)	(+)	(—)
17 α -Hydroxyprogesterone	(+)	(+)	(+)
Hydrocortisone	(+)	(+)	(—)

+ : 生成を示す。 — : 生成しないことを示す。
() 内はペーパークロマトグラフによる推定

又はケトン基の如く酸素分子を有するステロイドにおいては 3 α -ヒドロキシ体のみがえられ、その他のステロイドにおいては 3 α - 及び 3 β -ヒドロキシ体の両 isomer がえられるものと考えられる。したがって、ステロイド核の 11 位の酸素の存在は、本菌の 3-ケトン還元作用において比較的不安定とみなされる 3 β -ヒドロキシプレグナン体の生成を阻害するものと考えられる。なお、 Δ^4 の還元においては 11 位の酸素の存在の有無に関係なく、一様に 5 β 位に還元するが、これは本菌の有する酵素自体の立体化学的特異性によるものと思われる。いずれにせよ、本菌はステロイドの Δ^4 及び 3-ケトンの還元作用において顕著な基質特異性を有するものと思われる。又これらの還元反応においては、まずステロイドの Δ^4 が還元され、次いで 3-ケトンが 3-ヒドロキシ体に還元されて行くものと推察される。

要 約

かびの一種の *Alternaria bataticola* を各種のコルチコイドステロイドに作用せしめた結果、progesterone, deoxycorticosterone, Reichstein の Compound S, 17 α -hydroxyprogesterone 等からはそれぞれの 3-ケトプレグナン及び 3 α -並びに 3 β -ヒドロキシプレグナンの両 isomer が得られたが、これに対し corticosterone, cortisone, 11 α -hydroxyprogesterone, hydrocortisone 等の如くステロイド核の 11 位に酸素を有するステロイドからは、同じく 3-ケトプレグナンがえられたが、3-ケトンの還元物としては 3 α -ヒドロキシプレグナンの一つの isomer のみしかえられず、3 β -ヒドロキシ体はえられなかった。したがって本菌はこれらのステロイドの

これらの結果から *Alternaria bataticola* は一般のコルチコイドステロイドの Δ^4 及び 3-ケトンを還元して一様に 3-ケトプレグナン及び 3-ヒドロキシプレグナンを生成するが、3-ヒドロキシ還元体の生成において、その基質ステロイドの種類によって、3 α -ヒドロキシ体のみを生成する場合と、3 α - 及び 3 β -ヒドロキシ体の両 isomer を生成する場合の二つの場合が認められる。すなわち corticosterone, cortisone, hydrocortisone 及び 11 α -hydroxyprogesterone の如くステロイド核の 11 位に OH 基

還元において顕著な基質特異性を有していることが認められた。又これらの Δ^4 及び 3-ケトンの還元においては、まず Δ^4 が還元され、次いで 3-ケトンが還元されることを知った。

最後に本研究に当り終始御懇篤なる御指導を賜った東京大学応用微生物研究所津田恭介教授並びに朝井勇宣教授に感謝致します。又本研究の遂行に当り、御鞭達を賜った本研究部長松居宗俊氏に厚く御礼申し上げます。

(本研究は昭和 34 年 2 月 22 日、日本農芸化学会関東支部例会において発表した。又本研究は *Arch. Biochem. Biophys.*, 85, 227 (1959) にて速報した。)

(1) A. Butenandt, L. A. Suranyi : <i>Ber.</i> , 73, 818 (1940) ; L. Mamoli, G. Schramm : <i>Ber.</i> , 71, 2698 (1938).	(7) T. Reichstein et al. : <i>ibid.</i> , 23, 658(1940).
(2) D. H. Peteson et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 412, 5933 (1953).	(8) J. Fried et al. : <i>J. Org. Chem.</i> , 7, 362 (1942).
(3) D. Perlman et al. : <i>ibid.</i> , 74, 2126(1952).	(9) B. A. Koechlin et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 73, 189 (1951).
(4) B. Camerino et al. : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 36, 1945 (1953).	(10) F. Ungar et al. : <i>ibid.</i> , 76, 1197 (1954).
(5) S. Lieberman et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 263 (1948).	(11) J. J. Schnerder et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 194, 337 (1952).
(6) A. Wettstein et al. : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 23, 764 (1940).	(12) G. Roberts : <i>Infrared Absorption Spectra of Steroid I, II</i> . Interscience Publishers Inc., N.Y. (1958).

[農化 第 35 卷, 第 3 号, p. 206~209, 1961]

微生物によるステロイドの転換反応 (第 10 報)*

かびによるステロイド側鎖及び D 環の分解, 並びに 20 β -位還元

白坂 亮, 尾崎 雅子 (三共株式会社高峰研究所)

昭和 35 年 8 月 23 日 受理

微生物によるステロイド転換反応の内、ステロイド側鎖及び D 環の分解反応は比較的多くみられる反応である。すなわちこの反応は C₂₁ ステロイドの側鎖を C-17 にて分解し、又は更に D 環を C-13 及び C-17 にて分解し 6 員環ラク톤を形成する反応である。これらの分解は一応酸化の分解とみられているが、現在までに *Penicillium chrysogenum*, *Asp. flaviceps*, *Mucor mucedo* 等⁽²⁾が progesterone から testololactone を生成すること、又 *Asp. flavus*, *Pen. adametzi* 等⁽³⁾が 17 α -hydroxyprogesterone, deoxycorticosterone 又は Reichstein's compound S をそれぞれ testololactone に分解することが報告されている。

更に Visher⁽⁴⁾ らは *Fusarium solani* を用いて、progesterone 及び deoxycorticosterone より側鎖の分解された Δ^4 -androstendione をえているが、この菌はステロイド核に 17 α -OH 基を有する compound S や cortisone に対しては側鎖の分解を行わず、ただその 1-dehydro 体を生成するのみである。このことから Visher らはステロイドの有する 17 α -OH 基は、この菌による側鎖の分解を阻害するのであろうと述べている。

所で著者は前からのステロイド転換反応性についてのかび類の検索において、*Pythium ultimum* 又は *Penicillium citrinum* らが progesterone の側鎖及び D 環を分解して testololactone を生成することを見出したので、次いでこれらの菌を更に他のステロイドに作用せしめた結果、androstendione, 17 α -hydroxyprogesterone 及び deoxycorticosterone からは同様に testololactone がえられることが認められた。しかしこの菌を同様に Reichstein's compound S に作用せしめた所、この場合は testololactone の生成は認められず、その代り極性の非常に大きなステロイドの生成が認められた。このものは同定の結果 compound S の 20 β -還元体であることが判った。更に又この菌を corticosterone, cortisone 及び hydrocortisone 等の各ステロイドに作用せしめたが、

* Microbiological Transformation of Steroid. Part X. Degradation of Side Chain and D-Ring of Steroid and Reduction of 20-Ketone.

By Makoto SHIRASAKA and Masako OZAKI (Takamine Laboratory, Sankyo Co., Ltd.)