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.)

これらの場合は何れもなんらの変換ステロイド生成物はえられず、それぞれの基質ステロイドのみを回収した。これらの結果から、本菌はステロイドに対し多くの作用を有していることが認められるが、これらの反応において本菌は極めて興味ある一種の基質特異性を示すことが判った。以下これらについて述べる。

実 験 方 法

培養及び抽出法 グルコース 5%, ペプトン 2%, コンスタープリカー 0.5% よりなる培養液 (pH 5.2) 2 l を 500 cc 容振盪フラスコ 20 本に 100 cc ずつ分注し、15 lb, 20 分殺菌後冷却し、これに同様培地にて 27° にて 48 時間振盪培養せる *Pythium ultimum* の種培養を接種し、27° にて 48 時間振盪培養後、基質ステロイドの 2.5% メタノール溶液を各フラスコ当り 2 cc 宛添加し、更に同様に 42~72 時間培養を行う。培養終了後この反応液から菌体を除去し、濾液を醋酸エチルにて 2 回抽出し、この抽出液を 2% 重曹水及び水にて洗滌後、芒硝にて脱水し、減圧濃縮する。この濃縮物を下記の如きカラムクロマトグラフにかけ、生成ステロイドを単離且つ精製した。

ペーパークロマトグラフィ及びカラムクロマトグラフィ 生成ステロイドの検出にはペーパークロマトグラフィにて行なった。すなわち Zaffaroni の方法⁽⁵⁾を改変し、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、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。

又カラムクロマトグラフィとしては、50 g のアルミナ又は 80 g の Florisil を用いて行なった。展開液としてはアルミナの場合は、ベンゼン、ベンゼン-エーテル (95:5), (90:10), (50:50), 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), アセトンの各種の溶媒を用い、それぞれ 100 cc にて 2 回宛溶出した。又 Florisil の場合の展開液としては、エチレンジクロライド-アセトン (25:1), (20:1), (15:1), (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 を 2 回宛用いて行なった。以上の如くして得られた溶出フラクションはその溶媒を飛ばし、それぞれの残渣を上記のペーパークロマトグラフィにて検出し、同一物質フラクションを合し、アセトン又はメタノールより再結し、それぞれの生成ステロイドを精製した。

実 験 結 果

(1) **Progesterone の微生物的変換** 上述の如く *Pythium ultimum* を progesterone を基質として培養すると、その抽出濃縮物 1.46 g がえられた。このものはペーパークロマトグラフィ (PC) にて僅かの progesterone のスポットと、これよりも僅かに極性の大なる 1 個のスポットを示した。これらを分離するために上記の濃縮物を 100 cc のベンゼンにとかし、上述の如きアルミナカラムにかけ溶出を行うと、初めの溶出フラクションから若干の未反応 progesterone の結晶が回収され、次の溶出フラクションから同様にし、アセトンにて数回再結を行なって testolactone (I) の結晶がえられた。このものは m. p. 203~207°, $[\alpha]_D +50^\circ$ (CHCl₃), 元素分析は計算値, C₁₉H₂₆O₃: C 75.46, H 8.67%, 実験値: C 75.50, H 8.40%。紫外吸収 $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 238 m μ ($\epsilon = 17,900$), 赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1720 (lactone-CO), 1665, 1615 (Δ^4 -3-CO) cm⁻¹ を示し、これらの恒数及び赤外スペクトルは testolactone^(2,3) のそれらに一致する。したがって、本菌は progesterone の側鎖及び D 環を分解することが認められる。

(2) **Deoxycorticosterone の微生物的変換** 同様に deoxycorticosterone (DOC) を基質として *Pythium ultimum* を培養すると、その抽出濃縮物 (1.49 g) は PC にて僅かの DOC のスポットと、これより少しく極性の大きい 1 個のスポットが主として認められ、この外非常に極性の大きい二、三のうすいスポットが認められた。次いでこの濃縮物を 100 cc のエチレンジクロライドにとかし、上に述べた如く Florisil カラムにかけて分離すると、初めの溶出フラクションから若干の未反応の DOC の結晶がえられ、次の溶出フラクションから常法の如く溶媒をとばし、アセトンにて結晶せしめて 210 mg の結晶をえた。このものを更にアセトンにて再結を繰返すと testolactone (I) の結晶がえられた。このものは m. p. 202~205°, $[\alpha]_D +46^\circ$ (CHCl₃), 赤外吸収スペクトル $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1720 (lactone-CO), 1665, 1615 (Δ^4 -3-CO) cm⁻¹ を示し、これらは先の testolactone の恒数及び赤外吸収スペクトルに一致した。したがって本菌は DOC に対しても側鎖及び D 環の分解を行うことが認められた。

(3) **17 α -Hydroxyprogesterone の微生物的変換** 同様に 17 α -hydroxyprogesterone を基質として本菌を培養すると、その抽出濃縮物 (1.25 g) は PC にて 17 α -hydroxyprogesterone よりも僅かに極性の小さいス

ポットを示した. この濃縮物を常法の如く Florisil カラムにて分離すると, 若干の未反応の 17α -hydroxyprogesterone の結晶と, 170 mg の testololactone (I) の結晶とをえた. このものは恒数及び赤外吸収スペクトル並びに PC のスポット位置が testololactone のそれらに一致した. したがって本菌は 17α -hydroxyprogesterone から testololactone を生成することが認められた.

(4) **Androstendione の微生物的変換** 次に今まで用いて来たステロイドは全て側鎖及び D 環が分解されてラク톤を形成することがみとめられたが, この場合果して側鎖が分解されてから D 環が開裂するのか否かを検するために, その中間体と考えられる側鎖のとれた androstendione を基質として本菌を作用せしめてみた.

すなわち, androstendione を基質として本菌を培養すると, この抽出濃縮物は PC にて testololactone と同じ位置のスポットを示した. 次いでこの濃縮物をアセトンにとかし, 結晶せしめると 360 mg の結晶がえられた. このものは m.p. $203\sim 208^\circ$, $[\alpha]_D +51^\circ$ (CHCl_3) を示し, 恒数及び赤外吸収スペクトルは testololactone のそれらに一致した. したがって本菌は側鎖を持たない androstendione から testololactone を生成する故, 上記の如き側鎖を有する pregnane 系ステロイドにおいて, 本菌はまずこれらのステロイドの側鎖を切り, 次いで D 環を分解してラクトン環を形成するものと考えられる.

及びアセチル化により diacetate を生ずること及び元素分析にて酸素の増加がないこと等から, (II) は compound S の 20-位が還元されたものと考えられる. しかるに (II) 及びその diacetate の恒数は 17α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnene-3-one 及びその 20 β , 21-diacetate の恒数⁽⁶⁾に一致した. したがってこの結果から本菌

(5) **Reichstein's compound S の微生物的変換**

次に compound S を基質として同様に本菌を培養すると, その抽出濃縮物 (1.3g) は PC にて compound S よりも遙かに極性の大きな 1 個のスポットが認められた. このスポットは triphenyltetrazolium chloride (TPTZ) により呈色を示さなかった. 次いでこの濃縮物を常法の如く Florisil カラムにて分離すると, エチレンジクロライド-アセトン (2:1) の溶出部分から溶媒を飛ばし, アセトンより結晶せしめて 320 mg の粗結晶をえた. 更にアセトンにて再結すると m.p. $172\sim 177^\circ$ の結晶(II)がえられた. このものは $[\alpha]_D +71^\circ$ (dioxane) を有し, 元素分析の計算値, $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$: C 72.38, H 9.26%, 実験値: C 72.10, H 9.40% で, 赤外吸収スペクトルは $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} = 3480(\text{OH})$, 1655, 1620 (Δ^4 -3-CO) cm^{-1} であった. 又このものは無醋及びビリジンにて常法の如くアセチル化すると diacetate がえられ, この測定恒数は m.p. $190\sim 191^\circ$, $[\alpha]_D +112^\circ$ (dioxane) を示し, 元素分析の計算値, $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8$: C 69.42, H 8.39%. 実験値: C 69.63, H 8.71% であった. (II) は TPTZ にて α -ケトール反応を示さないこと, 赤外吸収が 20-ケトンの吸収を示さないこと

は compound S に対しては側鎖の分解を行わず, 20 β -位の還元を行うにすぎない. このことは本菌の反応における極めて顕著な基質特異性を示すものである.

(6) **その他のステロイドに対する作用** 次に上述のステロイドの他に corticosterone, cortisone 及び hydrocortisone に本菌を常法の如く作用せしめたが, これらの各ステロイドは PC にてなんらの変換ステロイドも示さなかった. 最後に *Penicillium citrinum*

を同様に今まで用いて来た全てのステロイドに作用させ、その変換ステロイドの生成を PC にて比較した結果、*Pythium ultimum* の場合と全く同じ結果を示した。

考 察

以上の如く *Pythium ultimum* を各種のステロイドに作用させた結果、testolactone 又は 20 β -還元体をえたが、この場合 progesterone の如く全く側鎖に水酸基をもたないもの又は 17 α -hydroxyprogesterone や deoxycorticosterone の如く側鎖に 1 個の水酸基のみを有するステロイドに対しては本菌はそれらの側鎖を分解し、更に D 環を分解してラクトン環を形成するが、これに対し compound S の如くその側鎖に dihydroxyacetone の如き 2 個の水酸基が存在すると、本菌はその側鎖の分解を行わず、その代りに 20 β -位還元のみを行うものと考えられる。すなわちその側鎖が dihydroxyacetone の型である場合は、その化学的構造上この菌の側鎖の分解に対してなんらかの抵抗性があるものと推察される。しかしながら上述の如き如何なる型の側鎖を有していても、corticosterone, cortisone 又は hydrocortisone の如くそのステロイド核の 11-位に水酸基又はケトン基の如き酸素を有しているステロイドに対しては、本菌は何んらの作用も示さないものと考えられる。この理由の一つの考えとしてかかる 11-位に酸素が存在しているステロイド分子は、その一連の型又は大きさの点でこれらのかびの細胞膜の透過になんらかの障害が存在し、したがって細胞内でのかかる反応が行われなかったのではないかと考えられる。いずれにせよこれらの菌はステロイドに対するかかる反応において、極めて複雑な一種の基質特異性を有しているものといえる。

要 約

Pythium ultimum 及び *Penicillium citrinum* を各種のステロイドに作用せしめ、progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, androstendione 及び deoxycorticosterone からは一様に testolactone を得、Reichstein's compound S からはその 20 β -hydroxy 還元体をえた。又 corticosterone, cortisone 及び hydrocortisone に対してはこれらの菌はなんらの作用も示さなかった。

本研究の遂行にあたり、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厚く感謝致します。又本研究に種々御便宜と御鞭撻を賜った本研究所所長松居宗俊氏に厚く御礼致します。

(1) 白坂 亮, 尾崎雅子: 本誌, 35, 200(1961).	(5) A. Zaffaroni et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 194, 749 (1951); 白坂 亮: <i>Chem. Pharm. Bull. Japan</i> , 投稿中.
(2) J. Fried et al.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 5764 (1953).	(6) P. L. Julian et al.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 1982 (1953).
(3) D. H. Peterson et al.: <i>ibid.</i> , 75, 5768 (1953).	
(4) E. Visher et al.: <i>Experientia</i> , 9, 371 (1953).	