0.4 g が回収できる。黄褐色粉末は 5% HCl 40 ml とともに水蒸気蒸溜し *p*-ニトロベンツアルデヒドを追出し残溜液から前記に従ってアミンを分離した。B₂ アミンは HCl 塩として 1.2 g 分別沈殿により 0.75 g (pH 6.5 まで), 0.25 g (pH 7.4 まで) を得たがペーパークロマトグラフィーで検出される程度の A₂ アミンを含有している。濾液から酢酸エチル抽出によって純 A₂ アミンを 1.3 g 得た。

(7) ジメチルスルホキシド: アミノ酸 2.4 g, アルデヒド 9.0 g, ジメチルスルホキシド 40 ml とともに直火で 78~91° に加温かきませ反応させると 5 分間で CO₂ 発生停止し, 低温のためビッチ状物質 (0.8 g) は少ない。水蒸気蒸溜残液中ペーパークロマトグラフィーで B₁ アミンが検出されなかった。B₂ アミン量が多い。

(8) ジメチルスルホキシド: アミノ酸 1.2 g (1 mM), アルデヒド 3.0 g (2 mM) を溶媒 30 ml 中 90~118° で 4 分間反応させる。B₂ アミン収量及び A₂ アミン収量ともにアルデヒド量の多い前記実験の方が多い。

(1) 江本 栄, 安藤 誠: 本誌, 35, 663(1961).	Soc., 1937, 1724; 1939, 809; 1949, 173.
(2) F. G. Baddar: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1949, 163; 1950, 136; 1954, 203.	(9) C. H. Tilford, R. S. Shelton, M. S. van Campen: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70, 4001 (1948).
(3) B. R. Brown, D. L. Hammick: <i>ibid.</i> , 1949, 659.	(10) N. H. Cantwell, E. V. Brown: <i>ibid.</i> , 75, 1489 (1953).
(4) N. H. Cantwell, E. V. Brown: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 4466 (1953).	(11) P. Nylén: <i>Z. anorg. allgem. Chem.</i> , 246, 227 (1941).
(5) C. W. Shoppee: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1931, 1225; 1932, 696; 1933, 1117.	(12) N. Kornblum, J. W. Powers: <i>J. Org. Chem.</i> , 22, 455 (1957).
(6) K. F. Bonhoeffer, W. D. Walters: <i>Z. physik. Chem.</i> , 181, 441 (1938).	(13) P. G. Sears, G. R. Lester, L. R. Dawson: <i>J. Phys. Chem.</i> , 60, 1433 (1956).
(7) A. P. Phillips, J. G. Murphy: <i>J. Org. Chem.</i> , 16, 954 (1951).	(14) L. W. Clark: <i>ibid.</i> , 60, 825 (1956).
(8) D. L. Hammick, P. Dyson: <i>J. Chem.</i>	

〔農化 第35巻, 第7号, p. 672~677, 1961〕

ステロイドの微生物変換に関する研究 (第1報)*

細菌類によるハイドロコーチゾンの 4'-脱水素作用

磯野正雄, 阿部又三 (武田薬品工業株式会社研究所)

昭和35年12月16日受理

緒 言

ステロイド化合物A環の C₁~C₂ 間に二重結合を導入して 4'-デヒドロ化合物とする反応は有効な副腎皮質ホルモンの製造, ならびにエストロゲン系の性ホルモン合成中間体の製造に重要な反応である。このため近時合成的方法と相まって微生物の脱水素作用を利用する方法が種々検討され, 4'-脱水素作用を有するものとして *Fusarium*^(1,2), *Calonectria*⁽²⁾, *Ophiobolus*⁽²⁾, *Alternaria*⁽²⁾, *Didymella*⁽³⁾, *Cylindocarpon*⁽³⁾, *Pseudomonas*⁽⁵⁾, *Protaminobacter*⁽⁶⁾, *Alkaligenes*⁽⁷⁾, *Corynebacterium*⁽⁸⁾, *Bacillus*^(9,10), *Mycobacterium*^(7,11), *Nocardia*⁽¹²⁾, *Micromonospora*⁽¹³⁾, *Streptomyces*⁽⁴⁾ などに属する各種の微生物が見出されるに至った。

著者らは国内各地の土壌から多数の菌株を分離し, それぞれのハイドロコーチゾン (I) に対する 4'-脱水素作用をしらべてプレドニソロン (II) 生成菌株の選択を行なった。

その結果供試の細菌類が I に対する酸化性から A 系, B 系および C 系の 3 群に大別されることを知った。A 系細菌群に属する菌株は I に対する酸化分解性が強く, I から II を生成するが, その II をもさらに酸化分解して消失させてしまい, B 系細菌群に属する菌株は I に対する酸化分解性をほとんど示さず, 基質として添加した I の大部分を培地中に残存させる。また C 系細菌群に属する菌株は A 系細菌株と同様 I から II を生成するが, その II

* Microbial Transformation of Steroids. Part I. 1-Dehydrogenation of Hydrocortisone by Bacteria. By Masao ISONO and Matazo ABE (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.)

菌	株	A系						B系						C系						細菌									
		基質添加量：10mg%						基質添加量：10mg%						基質添加量：10mg%						基質添加量：20mg%									
		ブレッド ニソロ ン		ハイド ロコ ン		ハイ チ ゾン		総ステ ロイド		ブレッド ニソロ ン		ハイド ロコ ン		ハイ チ ゾン		総ステ ロイド		ブレッド ニソロ ン		ハイド ロコ ン		ハイ チ ゾン		総ステ ロイド		ブレッド ニソロ ン		ハイド ロコ ン	
	A ₁	12.0	0	0	0	0	15.0	0	0	0	0	0	88.0	0	66.5	106.5	57.0	20.5	92.5	57.5	30.0								
	A ₁₀	12.5	0	0	0	0	17.0	0	0	0	0	0	107.0	0	81.0	107.0	59.5	20.0	111.5	97.0	22.0								
	A ₁₄	17.4	0	0	0	0	9.5	0	0	0	0	0	94.5	0	88.0	107.0	32.0	50.5	113.0	2.5	76.0								
	A ₁₅	15.0	0	0	0	0	2.0	0	0	0	0	0	89.5	0	77.5	105.0	50.5	27.0	92.0	28.0	54.0								
	A ₁₈	15.0	0	0	0	0	12.0	0	0	0	0	0	86.0	0	67.5	111.5	63.0	7.0	101.0	41.0	23.0								
	A ₂₄	13.5	0	0	0	0	12.0	0	0	0	0	0	98.0	0	93.0	108.0	65.0	14.0	103.0	60.0	34.0								
	A ₂₅	8.5	0	0	0	0	8.0	0	0	0	0	0	95.0	0	87.0	102.0	53.5	19.0	94.0	62.0	24.0								
	A ₃₁	18.5	0	0	0	0	25.0	0	0	0	0	0	96.5	0	79.5	108.0	76.0	27.5	101.5	58.5	30.5								
	A ₃₂	27.0	0	0	0	0	17.0	0	0	0	0	0	88.0	0	70.0	115.5	71.0	17.0	99.5	57.5	21.5								

第2表 A系細菌類によるハイドロコチゾンの酸化

菌株	基質 添加量 mg%	酸化時間4時間				8時間			16時間			24時間		
		総ステ ロイド	ブレド ニソロン	ハイド ロコチ ゾン		総ステ ロイド	ブレド ニソロン	ハイド ロコチ ゾン	総ステ ロイド	ブレド ニソロン	ハイド ロコチ ゾン	総ステ ロイド	ブレド ニソロン	ハイド ロコチ ゾン
		%	%	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%
A ₁	20	84.5	51.5	0		3.0	0	0	8.5	0	0	3.5	0	0
	40	92.0	11.0	81.0		5.5	0	0	6.0	0	0	4.5	0	0
	60	101.5	0	81.0		30.0	18.0	0	2.5	0	0	3.0	0	0
	80					87.5	36.0	42.0	54.0	34.0	10.0	5.5	0	0
	100					101.5	21.5	59.0	67.5	13.5	49.0	35.5	22.0	0
A ₁₅	20	67.5	34.5	11.0		6.5	0	0	4.5	0	0	2.0	0	0
	40					108.5	59.0	30.5	72.0	46.0	15.0	55.0	49.5	0
	60								94.5	23.5	60.5	104.4	68.5	2.5
	80											91.5	13.0	51.0
A ₃₁	20	89.5	48.5	27.0		10.0	0	0	16.5	0	0	2.5	0	0
	40	69.5	12.0	42.0		71.0	56.0	0	10.0	0	0	2.5	0	0
	60					94.0	41.0	32.0	8.0	0	0	2.0	0	0
	80					103.0	0	91.3	36.0	19.0	9.0	45.5	35.5	0
	100											93.5	13.5	76.0
A ₃₂	20	116.5	28.0	64.5		8.5	0	0	12.0	0	0	2.0	0	0
	40	97.0	2.0	86.5		12.0	0	0	14.5	0	0	3.5	0	0
	60					103.0	32.0	54.5	36.5	0	0	12.0	0	0
	80					96.5	5.0	88.0	86.0	38.0	25.0	64.0	51.5	0
	100											94.5	5.0	81.0

II. 供試細菌類のハイドロコチゾンに対する酸化性 著者らはまず土壌から分離した約400種の細菌株について基質I添加の下に振盪培養を行ない、各菌株のIに対する酸化性をしらべた結果、供試菌のIに対する酸化性からそれらがA, BおよびC系3つの細菌群に大別されることを知った。第1表はA, BおよびC系のお

のにおに属する菌種数株ずつについて基質Iを10あるいは20mg%添加の下に24時間酸化させた場合の成績を比較したものである。

(a) A系細菌群：第1表からまずA系細菌群に属する菌株においては培養終了時に定量される総ステロイド量が基質として添加したIの8~27%にすぎず、Iの大部分が酸化消失されてしまうことが知られる。また供試のどのA系細菌株についてもIばかりでなくIIも全く検出されない。このようにA系細菌株はIに対する酸化分解性が強く、これを消失させてしまう性質を有しているが、しかしその酸化においてIを多量

第1図 A, B および C 系細菌によるハイドロコチゾンの酸化様式

基質 (ハイドロコチゾン) 添加量 20 mg%
○—○ ハイドロコチゾン ●—● プレドニソロン ▲—▲ 総ステロイド

第 3 表 A₁ 株のハイドロコルチゾン酸化における酸素消費量と炭酸ガス発生量

ハイドロ コルチゾン (C ₂₁ H ₃₀ O ₅)	基質が完全酸化さ れる場合の理論値*			実 測 値		
	O ₂ μl	CO ₂ μl	RQ	O ₂ μl	CO ₂ μl	RQ
1.0 μM	582 (26 μM)	470 (21 μM)	0.81	74 (3.3 μM)	50 (2.2 μM)	0.68
2.0 μM	1164 (52 μM)	940 (42 μM)	0.81	142 (6.4 μM)	98 (4.4 μM)	0.69

反応液全容 3.0ml (主室: 0.1M リン酸緩衝液, pH 7.5, 2.3ml, ハイドロコルチゾン 1.0 および 2.0 μM, 側室: A₁ 株菌液 0.5ml, 副室: 20% KOH 水溶液 0.2ml), 反応温度 30°, 気相, 空気, 但し炭酸ガス発生量は間接法により測定した。

* 基質 (ハイドロコルチゾン) が完全に酸化される場合の酸素消費量と炭酸ガス発生量とは下記の反応式からこれを求めた。

化分解過程でⅡを生成するが、Ⅰの代りにⅡを与えた場合には第 2 図の成績から明かなようにⅡから逆にⅠを生成し、このⅠを時間の経過とともにさらに酸化分解し消失してしまう。また第 3 表は A₁ 株をⅠ添加の下で 16 時間培養し、その培養液から調製したⅠ適応静止型細胞についてⅠ 1 μM および 2 μM 当りの O₂ 消費量と CO₂ 生成量とを Warburg のマノメトリーによって測定した結果を示したものである。すなわちこの結果から A₁ 株はⅠ 1 M の酸化に 3~4 M の O₂ を消費して 2~3 M の CO₂ を発生することが知られたが、この値はⅠの完全酸化に使用される O₂ 量ならびに生成される CO₂ 量に比べればかなり少量のものである。

すでに明かなようにこれら 3 つの細菌群のうちⅠからⅡを生成し得る細菌株はすべて A 系または C 系に属している。著者らは供試細菌株約 400 種のうちから A 系細菌株として *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Nocardia* などに属する 47 株を、また C 系細菌株として *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Bacillus* などに属する 10 株をそれぞれ選び出した。

III. Δ'-脱水素作用を示す菌株の生理的諸性質 著者らは次にⅠからⅡを生成し得る細菌類の生理的性質を明らかにするため、A 系細菌類 13 株と C 系細菌類 7 株について硝酸還元性、硫化水素、インドールならびにアセチルメチルカルビノールの生成性、ブドウ糖に対する発酵性、メチルレッド試験、澱粉加水分解性、カタラーゼ作用、クエン酸に対する資化性および数種の芳香族化合物に対する資化性を *Manual of Microbiological Method*⁽¹⁷⁾ 記載の方法で比較検討した。もっとも芳香族化合物に対する資化性は Stanier の培地⁽¹⁸⁾ を用いてしらべた。第 4 表はその結果をとりまとめて示したものであるが、これを要約すれば次のとおりである。

(1) 供試のどの菌株もインドールとアセチルメチルカルビノールとを生成せず、また澱粉を加水分解しない。

(2) 供試菌株の大部分はブドウ糖に対して発酵性を示さない。また少数のこの発酵性を示す菌株においてもその作用はきわめて弱い。したがって供試のどの菌株についてもメチルレッド試験は陰性である。

に添加するかあるいは酸化時間を短縮するときにはⅡの生成が見られる。第 2 表は A₁, A₁₅, A₃₁ および A₃₂ の 4 株についてⅠ 20, 40, 60, 80 および 100 mg% 添加の下で 4, 8, 16 および 24 時間酸化させた場合の成績を示したものである。すなわちこの成績から供試のどの菌株についてもⅡの生成する事実が認められるが、同時にまたどの菌株もこのⅡを時間の経過とともにさらに酸化分解し消失してしまうことが知られる。

(b) **B 系細菌群** : 次に B 系に属する細菌株においては培養終了時に定量される総ステロイド量が基質として添加したⅠの 71~114% にもおよび、Ⅰに対する酸化性がほとんど認められない。もちろん添加したⅠの大部分は培地中に残存しておりⅡの生成も全く認められない。

(c) **C 系細菌群** : さらに C 系に属する細菌株は A 系のそれと同様ⅠからⅡを生成するが、一たん生成したⅡに対してはもはや酸化性を示さない。したがって C 系細菌株にⅠの酸化を行わせる場合は多量のⅡが蓄積し、培養終了時に定量される総ステロイド量も基質として添加したⅠの量とほぼ等しい。第 1 図は以上の A, B および C 系細菌群の代表菌株, A₁, B₂₀ および C₁₁ の各培養について総ステロイド量, ⅠおよびⅡの経時的变化を比較したものである。

なお, A 系細菌株は上述のようにⅠの酸

第4表 Δ' -脱水素作用を示す細菌類の生理的性質

菌株	硝酸還元性	H_2S の生成性	インド生成性	アチノセチルメビ成性のカルの生	Δ' -脱水素作用の発酵性		メドチルレツ	澱粉加水分解性	カタラーゼ	資 化 性			
					ガスの生成	酸の生成				クエン酸	フェニル酢酸	安息香酸	p-ハイドロオキシ安息香酸
A ₁	+	+	—	—	—	±	—	—	+	+	—	—	+
A ₁₀	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	±	+	+
A ₁₄	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+
A ₁₅	+	—	—	—	—	±	—	—	+	+	±	±	+
A ₁₈	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
A ₂₄	—	+	—	—	—	±	—	—	+	+	+	—	+
A ₂₆	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
A ₂₇	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	±	+	+
A ₃₀	—	+	—	—	—	±	—	—	+	+	+	+	+
A ₃₁	—	+	—	—	—	±	—	—	+	+	+	—	+
A ₃₂	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	±	+
A ₃₇	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+
C ₁	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
C ₄	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
C ₅	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
C ₈	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	±	+
C ₉	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	±	+
C ₁₀	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
C ₁₁	+	+	—	—	—	±	—	—	+	+	+	±	+

(3) 供試の各菌株はともに好気性でカタラーゼ作用を有する。

(4) 供試菌株のうち *Bacillus* に属するもののほかはいずれも芳香族化合物を資化する。

考 察

供試細菌類のうちA系細菌群に属する菌株はいずれもIに対して強い酸化分解性を示し、これを消失させてしまいが、その酸化過程でIIを一時的に生成する。この事実はIIがIの酸化分解における代謝中間物質であることを示すとともに、今後の研究課題としてA系細菌株がどのような酸化過程をたどってIおよびIIを分解するか、また酸化分解の最終産物がいかなるものであるかというような問題を提示している。事実 Warburg マノメトリで得られた結果からみるとステロイドの炭素骨格の一部は炭酸ガスにまで酸化されず、なんらかの形で培養液中に残存すると考えられる。

次にA系細菌株を用いてIを酸化すると著者らのいわゆる総ステロイド量は時間の経過とともに減少するが、その量はIおよびIIが全く検出されなくなった時期においてもなおかなり多量見出される。これは総ステロイド抽出物中にIあるいはIIと異なるステロイド化合物もしくはこれらステロイド類と性質の類似したなんらかの物質が混在するためと考えられる。このことはまたB系あるいはC系細菌株の場合も同様で、総ステロイド量は常にIおよびIIの量の和よりも大きい。

なおここに注目されることは Δ' -脱水素作用を示す細菌類の大部分が芳香族化合物とくに p-ハイドロオキシ安息香酸に対して資化性を有することである。このことは細菌類によるステロイド環の酸化と芳香環の酸化との関連性を暗示しているばかりでなく、将来 Δ' -脱水素作用を示す細菌類の探索に大いに役立つものと考えられる。

要 約

(1) 土壌から約400種の細菌株を分離し、それらのハイドロコチゾン(I)に対する Δ' -脱水素作用をしらべた。

(2) 供試の細菌株はIに対する酸化性からA, BおよびC系の3群に大別された。

(3) A系細菌群はIに対する酸化分解性が強く、Iからプレドニソロン(II)を生成するが、そのIIをもさらに酸化分解して消失させてしまい、B系細菌群はIに対する酸化分解性をほとんど示さず、またC系細菌群はIからIIを生成するが、一たん生成したIIに対してはもはや酸化性を示さない。

(4) A系およびC系に属する菌株として選択された57株は分類学上 *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Nocardia* (A系細菌株は以上のいずれかに所属する), *Micrococcus*, *Flavobacterium* および *Bacillus* (C系細菌株は以上のいずれかに所属する) に属する。

(5) A系細菌株 13 株, C系細菌株 7 株について硝酸還元性, 硫化水素, インドールならびにアセチルメチルカルビノールの生成性, ブドウ糖に対する発酵性, メチルレッド試験, 澱粉加水分解性, カタラーゼ作用, クエン酸に対する資化性および数種の芳香族化合物に対する資化性をしらべてこれを明らかにした。

終りに臨み終始御指導と御鞭撻とを賜った研究所長桑田智博士ならびに醗酵研究所所長佐藤喜吉博士に深甚の謝意を表します。

本研究は昭和 34 年 4 月 9 日, 東京大学における日本農芸化学会大会シンポジウム席上で口述発表した。

(1) E. Vischer, A. Wettstein : <i>Experientia</i> , 9, 371 (1953).	(11) G. M. Shull, D. A. Kita : Belg. Patent, 538,327 (1955).
(2) E. Vischer et al. : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 38, 835 (1955).	(12) T. H. Stoudt et al. : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 74, 280 (1958).
(3) E. Vischer et al. : <i>ibid.</i> , 38, 1502 (1955).	(13) G. M. Shull : U. S. Patent, 2,809,919 (1957); <i>Chem. Abstr.</i> , 52, 2954 (1957).
(4) J. Fried et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 5764 (1955).	(14) R. B. Burton et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 763 (1951).
(5) H. R. Levy, P. Talalay : <i>ibid.</i> , 79, 2658 (1957).	(15) A. Zaffaroni, R. B. Burton : <i>J. Biol. Chem.</i> , 193, 749 (1951).
(6) G. M. Schull : U. S. Patent, 2,776,927 (1957); <i>Chem. Abstr.</i> , 51, 8152 (1957).	(16) W. J. Mader, R. R. Buch : <i>Anal. Chem.</i> , 24, 666 (1952).
(7) D. Sutter et al. : <i>J. Org. Chem.</i> , 22, 578 (1957).	(17) Society of American Bacteriologists : <i>Manual of Microbiological Methods</i> (1957).
(8) A. Nobile et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 4184 (1955).	(18) R. Y. Stanier : <i>J. Bacteriol.</i> , 54, 339 (1947).
(9) T. H. Toudt et al. : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 59, 304 (1955).	
(10) F. Lindner et al. : <i>Naturwiss.</i> , 43, 39 (1956).	

[農化 第 35 卷, 第 7 号, p.677~680, 1961]

ステロイドの微生物変換に関する研究 (第 2 報)*

2 種細菌の混合培養によるハイドロコチゾンの酸化

磯野 正 雄, 阿 部 又 三 (武田薬品工業株式会社研究所)

昭和 35 年 12 月 16 日 受 理

緒 言

著者らはさきに土壤から分離した細菌類のハイドロコチゾン (I) に対する酸化性をしらべた結果, それらが I に対して強い酸化分解性を示す A 系細菌類, I に対する酸化分解性をほとんど示さない B 系細菌類および I を酸化してプレドニソロン (II) を生成集積する C 系細菌類の 3 つの細菌群に大別されることを認めるとともに A 系細菌類が I の酸化過程で II を一時的に生成することをも明らかにした。

今回は A 系細菌株を用いて I の酸化を行なう場合, B 系あるいは C 系細菌群に属する任意の菌株を併用すれば A 系細菌株による II の酸化分解が抑制され, 多量の II が蓄積されるという事実を認めたのでこれを報告する。

なお Lindner ら⁽¹⁾は *Rizopus* と *Bacillus* との混合培養菌体を用いてコチゾンの酸化を行ない, 著者らの得た結果と類似した現象を認めている。

実 験 の 部

I. 実験方法 供試菌株, 培養法, ステロイドの酸化法およびその定量法などは, いずれも前報記載の方法にしたがってこれを行なった。

* Microbial Transformation of Steroids. Part II. Oxidation of Hydrocortisone by the Mixed Culture of Different Bacteria.

By Masao ISONO and Matazo ABE (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.)