天然物化学への微生物化学の応用

単位反応としてみた微生物変換反応

奥田 重信*・飯田 貢*

An Unique Application of Microbial Chemistry for Natural Product Chemistry.

Microbial Transformation, as Unit Chemical Processes.

Shigenobu OKUDA* and Mitsugi IIDA*

はじめに

微生物は他の高等な動植物に比して、その種類の豊富さ・ライフサイクルの早さ・培養条件のコントロールや無細胞酵素系の分離の容易さ・合目的性に立脚した多様なスクリーニング法の発達等、天然物生産や生合成機構の解明の面から見て極めて有利な特徴があり、天然物化学研究の大きな領域を占めてきたことは、今さらいうまでもないところである。また新しい生理活性なあるいは有用な物質（抗生物質など各種の医薬品・必須アミノ酸・補酵素・呈味物質さらには未来のタンパク源たとえば石油タンパクなど）の工業的生合成系として、微生物の果す役割は今後もますます増大するであろうことが予想されている。このようにぼう大な領域にわたっての微生物代謝物の化学研究が、天然物化学にどのように貢献し、また将来どのように応用されてゆくかを考えることはきわめて興味がある。しかしあまりに多岐にわたるので焦点を絞って、ここではいわゆる「有機化合物の微生物変換*」において、微生物を試薬の一種と見立てた場合、どのような試薬でどのような反応を行なうことができ、天然物化学あるいは有機合成化学の研究にどのように応用できるかという点について、若干の実例をあげて説明してゆくことにより、読者諸賢がそれぞれの専門的

立場からこの試薬の限界・応用のおもしろさなどをご批判頂きたい。

現在まで、ステロイド、ステロイドサポゲニン、cardenolide, bufadienolide, テルペン、アルカロイド、炭化水素、芳香族化合物、抗生物質などかなり広範囲にわたって、微生物変換の報告がなされているが、なんといってもステロイド系化合物に関する研究が圧倒的で、1950年代には副腎皮質ホルモン合成のためプレグナン系化合物の微生物変換に関してぼう大な研究が行なわれた。したがって記述がややもすればステロイド系化合物にかたよりがちであることをお許し願いたい。

微生物の行なう変換反応には大別して、1) 酸化 2) 還元 3) エステル化およびアミドの形成 4) 加水分解 5) 異性化 6) ハロゲン化その他種々の反応、などがあり、ここでは主に酸化と還元について述べて行く。本論で各単位反応について述べる前に、化学反応と微生物変換反応の差について二三ふれておく。

I. 微生物変換反応の特性と培養条件 などについて

1. 基質特異性 化学試薬は、反応性の強さ・若干の立体特異性などそれぞれの特色があるが、一般に相当広範囲の巾があるのが通常である。たとえば活性二酸化マンガンは、アリールアルコールであれば、直鎖であれ環状であれ酸化して α, β -不飽和カルボニル化合物を生産する。しかし微生物変換では、酵素反応の特性として高度の基質特異性（①対称体の一方では反応が進行するが、他方では進行しないか別の型式で反応が行なわれる。②分子内の反応中心より遠く離れた位置の構造の差

* 東京大学応用微生物研究所()

* Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo ()

* この定義自体も、広義に解釈すれば、微生物の代謝全般におよぶこととなるので、ここでは「外から加えられた有機化合物（基質）が、微生物の酵素により、母核の徹底的分解など母核を容易に見出し得ないほどの大きな変化を伴うことなく、類縁体に変換される反応」と狭義に考える。

が、反応の進行や反応の起る部分の決定に強い影響を与える、など)がある。

したがって厳密に言えば、「同一株の微生物・同一の培養条件(物理的因子:温度・培地の滲透圧・振盪の条件など、化学的因子:炭素源/窒素源の比率・pH、内部因子:菌株の生育期(対数、定常)と基質添加の時期など)・同一基質」によってのみ、はじめて充分の再現性ある変換結果が得られる。とはいえ、類似の化合物が同一株の微生物により同様な反応を受けるであろうという予想のもとに実験計画をたてることは、一向に差しつかえなく、ただ予想のごとく反応が進行しない場合がしばしばあることに充分留意しておく必要がある。

一見不便に思われるこの基質特異性は、目的に適合した微生物を見出し、あるいは変異などにより創りだし、その最適変換培養条件を設定し得た場合には、(1)通常の化学試薬の攻撃し得ぬ不活性部位の直接攻撃(水酸化反応など)(2)一方の対掌体のみの反応を利用する有用光学活性体の分割(3)緩和な生理的条件下で高度の特異性のある反応が進行するので、不安定なほかの官能基の保護が不必要、などの有利な特徴を示し得る。

2. 基質の濃度と添加法 基質が培養液に溶解する場合は問題ないが、難溶な場合は微細な懸濁液としてできるだけ微生物との接触・取込みをよくしてやる必要がある。そのため微生物の生育に害を与えず基質を溶解する溶媒(アセトン・ジメチルホルムアミドなど)の少量に溶解して添加したり、表面活性剤を溶解補助のために加えたり種々の工夫が行なわれる。

また基質自体微生物にとって異質である場合が多く、生育・代謝系の阻害など種々の影響を与えるから、「基質の量と添加法・添加時期」は実験的に最適条件を設定せねばならない。一般にステロイド化合物などでは、前培養を行なってある程度菌が生育し、汚染の危険が少なくなってから、培地 100 ml あたり 50~100 mg の基質をアセトンなどに溶解して加え懸濁させて培養をさらに継続し、基質の変換状況を薄層クロマトなどで検討して培養の終了時期を決めるのが、実験室で通常行なわれる方法である。

後述する「*Arthrobacter simplex* (ATCC 6946) による cortisol から prednisolone の合成」のように特殊な場合を除いて、一般に基質濃度が低い点や反応時間が比較的長く収率がやや不安定な点がこの微生物変換反応の欠点といえる。

3. 休止菌体による変換反応 生育菌体を用いる変換法が一般に用いられているが、培養系が複雑なため、その変換反応系の制御が困難となり、収率の不安定性を

きたし、また高濃度基質の添加による生育阻害などの欠陥があらわれがちである。

各増殖期(対数・定常期)の菌体を集菌洗浄し、この適当な懸濁液(リン酸緩衝液、Tris-緩衝液など)に基質を加えて変換反応を行なわせる、いわゆる「休止菌体」の反応系は、反応制御による変換物の大量蓄積・収率の安定化が可能であり、また途中の反応の進行状況の検討・変換物の抽出も安易となる。たとえば休止菌体による L-アスパラギン酸の製造について、*Pseudomonas trifolii* PY-7¹⁾ はフマル酸から短時間にモル収率 95% 以上の高率で、しかも 15 g/dl 以上の高濃度で L-アスパラギン酸を生成蓄積する。L-アスパラギン酸生成の反応は次の二つの反応が同時に起っていると考えられる。

II. 単位反応としての微生物変換反応

1. 酸化反応 微生物変換反応において行なわれる酸化反応を単位反応として分類してみると次のようになる。

- a) 水酸化 b) 脱水素 c) エポキシ化 d) アルコールのケトン・アルデヒドへの酸化 e) ケトンのラクトンあるいはエステルへの酸化 f) スルフィドのスルホキシドへの酸化 g) アミンのケトンへの酸化 h) 酸化的分解(ステロイドの側鎖の切断・19位メチルの酸化的脱離を経るA環芳香化などをも含める)

i. 水酸化 微生物変換の特色が最もユニークにあらわれているのがこの水酸化反応で、一番有名でわかりやすい例として、副腎皮質ホルモンに必須の 11-位の酸素官能基の導入について考えてみよう。化学的には 12 位に酸素官能基のある胆汁酸類・hecogenin, botogenin などから出発して、隣りの 11 位を水酸化するか、または $\Delta^{5,7}$ -diene を $\Delta^{7,9(11)}$ -diene に導きこの $\Delta^{9(11)}$ の二重結合を足掛りにして、11 位を攻撃するなどの方法があるが、合成経路として煩雑で実用的ではない。これに比較して 11-水酸化菌による方法は格段に有利で、この方法の登場により、糖質副腎皮質ホルモンの値段は 200 \$/g (1949 年) から 0.45/g (1965 年) に低下した。参考までに cortisone の「微生物変換反応と化学反応の組合せ」による hydrocortisone の製法を下に示す。

Upjohn 方式

acid ($n=2$)³⁾ の 11α -水酸化がわずかに報告されているにすぎない。

c. cardenolide, bufanolide 系化合物 強心配糖体のアグリコンであるこれらの化合物には、不飽和ラクトン環が存在し、化学的酸化に対して不安定であるので、生理的条件下で反応が進行する微生物水酸化は、新生理活性物質の合成法として興味がある。

$3\beta, 14\beta$ -dihydroxy- 5β -card-20(22)-enolide (digitoxigenin)

$3\beta, 14\beta$ -dihydroxy- 5β -bufa-20, 22-dienolide (bufalin)

Digitoxigenin あるいはその 16β -OH 体である gito-xigenin の水酸化反応は、ほとんどカビによって行なわれており、 $1\beta, 5\beta, 6\beta, 7\beta, 11\alpha, 12\beta, 16\beta$ -位に水酸基が導入されている。*Gibberella saubinetii*⁴⁾ により 12β -OH 体が 70% の得量で得られること、*Rhizopus nigricans* ATCC 6227 b⁵⁾ (pregnane 系化合物の 11α -水酸化菌として有名) によって、 7β -OH 体が 59% の得量で得られ他に少量の 1β -OH 体、 5β -OH 体が得られるが、 11 -水酸化が起きない点は興味深い。

Bufalin, marinobufagin (bufalin の 5β -OH, $14\beta, 15\beta$ -epoxide), regibufogenin (bufalin の $14\beta, 15\beta$ -epoxide) などの bufadienolide は、*Fusarium lini* により 12β -水酸化される。この菌は cardenolide も同様に 12β -水酸化するが、4-androsten-3-one, 4-pregnen-3-one 系化合物では 15α -水酸化を行なう。その理由として、Tamm

ら⁶⁾は bufanolide, cardenolide では下図のように 15α -位は $4\alpha, 7\alpha, 9\alpha$ -H で蔽われており、酵素反応が起りにくく、一方 12β 位は遮蔽されていないからであると推論している。

d. ステロール ステロール 微生物変換の最大の目標は、後

述のように天然にもっとも多量に存在するコレステロールから、いかに安価に得量よくステロイドホルモン原料 androstane (C_{19}), pregnane (C_{21}) 系化合物を製造するかであり、水酸化反応自体にはあまり興味がもたれていない。cholesterol は *Proactinomyces roseus*⁷⁾ によって 7 位に水酸基が導入され、 $6\beta, 19$ -oxidcholest-4-en-3-one は CSD-10⁸⁾ により 9α -水酸化される。

e. Sapogenin diosgenin は progesterone の原料として有名であるが、*Helicostylum piriforme* ATCC 8992⁹⁾ によって 10~15% の得量で $7\beta, 11\alpha$ -位に水酸基が導入される。

f. ステロイドアルカロイド 各種のステロイド化合物の微生物変換により得られた多くの知見に刺激されて、この新しい合成法の応用対象の一つとして、ステロイドアルカロイドが選ばれたのは当然で、*Aspergillus ochraceus* は conessine¹⁰⁾ の $7\alpha, 7\beta$ -位に、*Helicostylum piriforme* ATCC 8992 は solasodine¹¹⁾ の $7\beta, 9\alpha, 11\alpha$ -位 tomatidine¹²⁾ の $7\alpha, 9\alpha, 11\alpha$ -位に水酸基を導入することが見出された。

g. 種々の変型ステロイド化合物 望ましい薬理活性の増強と好ましくない副作用の減弱を狙って、多数の変型ステロイド誘導体が合成され、それらのうちかなりの数の化合物の微生物変換が行なわれている。たとえば $16\alpha, 17\alpha, 21$ -[3, 1, 1-(2-pyrazolino)]-4-pregnene-3, 20-dione は¹³⁾ *Metarrhizium sp.* の菌により、67% の好収量で 11α -水酸化される。

h. Yohimbine 類縁アルカロイド 生理活性の増強

を狙い、合成の手法としてアルカロイドの微生物変換を最初に行なったのは、Godtfredsen (デンマーク)¹⁴⁾, Weisenborn (アメリカ)¹⁵⁾ で共に製薬会社の研究者で、時期も、対象もきわめて近いことはおもしろく思われる。yohimbine, α -yohimbine, β -yohimbine, apoyohimbine, 3-epiapo-yohimbine, corynanthine らの 10^{14,16)}, 11¹⁶⁾, 18¹⁵⁾, 18 β -位¹⁴⁾ に *Cunninghamella*, *Streptomyces* などの菌により、水酸基が導入されることが報告されている。

i. その他の化合物 アルカロイドとしてはそのほかに、麦角アルカロイドの agroclavin, erymoclavin が *Psilocybe sempervina*¹⁷⁾ により, (+)-codeinone* が *Trametes sanguinea*¹⁸⁾ により, ルピンアルカロイドの一種 lupanin が *Pseudomonas lupanini*¹⁹⁾ によりそれぞれ下図のように水酸化される。

また (+)-camphor は *Pseudomonas* 属²⁰⁾ の菌によ

* 天然の阿片アルカロイド (-)-codeine から誘導される (-)-codeinone の対称体である。

り 5 α , 5 β -位が水酸化され, α -pinene は *Aspergillus niger*²¹⁾ により *cis*-verbenol, verbenone, *trans*-sobrerol に導かれる。

fenchone および isofenchone は *Absidia orchidis* により 6 位あるいは 2 位が *endo* および *exo*-水酸化される²²⁾。

j. 水酸化反応の立体化学について 以上水酸化反応について若干の例をあげて説明してきたが、全く活性化されていない脂肪族炭素の水酸化反応 (ステロイドの不活性メチル・メチレン・メチンの水酸化等), 芳香族炭素 (yohimbine 型化合物の 10, 11 位), allylic 炭素 ((+)-codeinone の 14 位, α -pinene の 3 位等), 2 重結合の炭素 (麦角アルカロイドの 8 位, α -pinene の 2 位等), 窒素の隣りの炭素 (lupanine の 17 位) 等の水酸化反応を全く同じと考えることは危険である。

たとえば、ステロイドの不活性炭素の水酸化の場合は、次の 2 つの条件が守られていると考えられる。①水酸基の酸素はガス状の酸素に由来する。(18O を含んだ気層で反応して得られる水酸化体には 18O が取り込まれるが、H₂¹⁸O を含む水を用いても生成する水酸化体には 18O は含まれないことにより証明²³⁾) ②水酸化される炭素の配置は常に保持され、導入される水酸基は置換される水素と同じ配位を持つ (水酸化される位置を、あらかじめ立体特異的に ³H ラベルした基質の水酸化反応を吟味して証明²⁴⁾)。これに反して麦角アルカロイドの芳香核の水酸化反応では、水酸化される位置の水素が隣の炭素へ転移する NIH シフト*が起っている可能性が強い。

一株の菌が何種類かの異なった位置を水酸化する例は、多数知られており、このような場合それぞれ対応する各々の酵素が存在するのかも知れないが、*Aspergillus tamarii* が androsterone の 6 β , 7 β , 11 β -位を水酸化する反応について次のような仮説が提出されている²⁵⁾。「基質の C₃, C₁₇ 位の酸素官能基が「基質・酵素複合体」の形成に有意の作用をしていることが予想され、この両者 (C₃, C₁₇) を結ぶ直線の両側に、ほぼ同様の関係位置を占める 6 β , 7 β , 11 β 位は、同一の酵素によって水酸化さ

* 最近米国 National Institute of Health の B. Witkop および S.

Udenfriend らにより明らかにされた芳香核水酸化反応の際に起る水素の転移である²⁶⁾。例としてトリプトファン の 5 位の水酸化反応を図に示す。

れる可能性がある。」

k. 水酸化酵素について 次に mixed function oxidase あるいは monooxygenase に属すると考えられるこれらの水酸化酵素について、現在まで知られている知見について簡単にふれておきたい。

ステロイドの酵素的酸化反応は立体配位に関連性を持っていることが知られている。炭素原子に axial 酸素官能基を導入する能力のある水酸化酵素は dehydro 体を axial エポキシドに変換する能力をもっている²⁷⁾。たとえば 11 β -水酸化酵素は 9(11)-dehydrocortisolone を NADPH と O₂ の反応条件で、9 β , 11 β -oxidocortisolone を生成する²⁸⁾。このことは、飽和ステロイドとそれと類似の不飽和ステロイドが酵素の同じ site に結合されることを示している²⁹⁾。ステロイド水酸化反応の電子伝達系に關与する構成成分に關して動物組織のミトコンドリアの 11 β -水酸化酵素には 3 つの構成成分が必須である³⁰⁾。すなわちフラビンタンパク (adrenodoxin reductase), 非ヘム鉄タンパク (adrenodoxin) およびヘムタンパク (cytochrome P-450) である。NADPH における adrenodoxin の酵素的還元は adrenodoxin-reductase によって触媒され、この酵素はミトコンドリア粒子と結合して活性化され、これを超音波などにて遊離させると部分的に失活する³¹⁾。この酵素は約 60,000 の分子量をもち、明確ではないが鉄を補欠分子族とする flavin-adenine dinucleotide の 1 モルを含有している³²⁾。adrenodoxin は分子量約 13,000~15,000 で、これは鉄二原子と 2 モルの可変的サルフト (タンパクモル当り) を含有している³³⁾。cytochrome P-450 ははじめ副腎皮質のミトコンドリア中に発見され³⁴⁾、これは deoxycortisolone の 11 β -水酸化に關し末端酸化酵素として働くようである。この P-450 は *Pseudomonas* からも見だされている³⁵⁾。

ステロイドの水酸化と電子伝達系との関連は次に示すように推定されている。すなわち NADPH からの電子は adrenodoxin-reductase, adrenodoxin をへて P-450 へ伝達される。活性混合体 RH (基質)-P-450-Fe⁺⁺-O₂ を形成し、deoxycortisolone が分子状酸素と反応して R-OH

NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Fp=adrenodoxin-reductase
NHIP=adrenodoxin
P-450=cytochrome P-450
RH=substrate

と H₂O が生成する。水酸化反応の過程で、P-450-Fe⁺⁺ は P-450-Fe⁺⁺⁺ へ酸化される³⁶⁾。

ii. 脱水素

a. ステロイド系化合物 ステロイドの母核の 4¹, 4⁴, 4⁷, 4⁹(¹¹), 4¹⁴, 4¹⁶ 化が報告されている。この脱水素反応の最初の例は、*Azotobacter* 属の菌によるコレステロールの 7-dehydro 体への変換反応である³⁷⁾。

4¹ 化は *Cylindrocarpum radicola* による progesterone, testosterone, compound S の 1-dehydrotestolactone への変換³⁸⁾によって、最初に見出された。のちになって *Corynebacterium simplex* によって cortisone, hydrocortisone が prednisone, prednisolone* に好収量でそれぞれ変換³⁹⁾されることが契機となって、多数の研究が行なわれ、これらの合成副腎皮質ホルモン製造に微生物変換が応用される端緒となった。この目的の重要な 4¹-化菌としては、*Bacillus sphaericus*⁴⁰⁾, *Bacterium cyclo-oxydans*⁴¹⁾, *Septomyxa affinis*⁴²⁾ などがある。なお近藤らが *Arthrobacter simplex* を用いて行なった prednisolone の製造は、驚くべき高濃度の hydrocortisone (50 g/100 ml) を 97% の高得量で目的物に変換でき、粉末の基質を加えると生成物が結晶状に析出するところから “pseudocrystallo-fermentation” と名づけている⁴³⁾。

4¹⁴-化は *Fusarium solani* による 5 α -androst-3, 17-dione の 1, 4-androstadiene-3, 17-dione への変換⁴⁴⁾が最初の例で、同様な脱水素反応は *Nocardia blackwellii*⁴⁵⁾, *Corynebacterium simplex*⁴⁶⁾ が、胆汁酸系⁴⁷⁾では *Streptomyces*, *Corynebacterium* 属の菌が行なうことが知られている。下図に示すように

* prednisone, prednisolone の抗リウマチ作用は、もとの天然副腎皮質ホルモンのそれぞれ約 4 倍で、塩類・水分貯留の副作用は認められないといわれている。

4^1 あるいは 4^4 -モノエンの形成が認められ、これらはジエンに導かれるのかあるいはジエンの還元によって生成するのかはっきりしていない。

$4^9(11)$ 化は estrone の *Glomerella fusaroides* による微生物変換⁴⁸⁾で認められたが、この菌は元来 estrone 系化合物の $7\alpha, 15\alpha$ 位の水酸化を行なう。

4^{14} -化は *Wojnowicia graminis* による testosterone の変換⁴⁹⁾の際に 12β -水酸化と共に認められるが、これは真の脱水素化でなく 14α -水酸化後脱水によって生成したものと考えられている。

4^{16} -化は digitoxigenin の *Trichothecium roseum*⁵⁰⁾ による処理の際に認められるが、この場合も 17α -水酸化体の脱水による可能性がないとはいえない。

b. 脱水素酵素について ステロイドのA環に作用する3種の立体特異的脱水素酵素 (4^1 -化, A/Bトランス・ステロイドの 4^1 -化 (以下 $4^1(5\alpha)$ -化と略), A/Bシス・ステロイドの 4^1 -化 (以下 $4^1(5\beta)$ 化と略))⁵¹⁾ が *Pseudomonas testosteroni* の無細胞系から分離されている。 4^1 -および $4^1(5\alpha)$ -化酵素は細胞膜の微粒子と結合しており、 $4^1(5\beta)$ -化酵素は可溶部に存在している。testosterone, progesterone を基質として培養し、酵素の誘導を促した場合には、100倍活性の酵素が得られる⁵²⁾。

“フラビンの水素受容体としての PMS (phenathine methosulfate) とキノンの作用” “atabrine による脱水素反応の阻害と FAD による作用の回復” “基質と medium との水素交換” などの実験によって、この酵素がフラビンタンパクであることが明らかにされている。フラビンが脱水素反応の第一次の水素受容体で、キノンは第二次の受容体と考えられている。

また *Bacillus sphaericus* の無細胞系でもビタミン $K_{2(35)}$ (キノン体) が 4^1 -化酵素の補酵素であることが認められている。最近 *Bacillus cyclooxydans* についても、 4^1 -化および 4^1 -還元酵素系が分離されたが、精製してもこの両者の活性を分離することができず、活性の増強が平行するので同一の酵素であろうと考えられて

いる⁵⁴⁾。この還元酵素は $NADH_2$ により、脱水素酵素は menadione によってのみ活性が促進される。この酵素活性は androsta-1, 4-diene-3, 17-dione によってもっと

もよく誘導され、 5α -androsta-1-ene-3, 17-dione の場合には活性が 1/4 程度であった。

酵素反応の立体化学については、*Bacillus sphaericus* の 4^1 -化酵素は $1\beta, 2\alpha$ -置換 (OH または CH_3) 体は脱水素するが $1\alpha, 2\beta$ -置換体ではこの反応を行わないので、 $1\alpha, 2\beta$ -H のトランス脱離がまづ予想された⁵⁵⁾。さらに $1\alpha, 1\beta$ を立体特異的に重水素化した基質を用いたり⁵⁶⁾、 3H_2O 中で反応を行なった結果下図のような機構が現在考えられている⁵⁷⁾。

iii. エポキシ化反応 14α -(axial)-水酸化を行なう *Cunninghamella blakesleeana*⁶²⁾ は 4^{14} -dehydrocortisolone を $14\alpha, 15\alpha$ -エポキシドに、 9α (axial) を水酸化する *Curvularia lunata*⁶²⁾ は $4^9(11)$ を $9\alpha, 11\alpha$ -エポキシドに変換する*。また 11α (equatorial)-水酸化菌である *Rhizopus nigricans* は 4^{11} -progesterone をエポキシドにすることはできないが、 11β (axial) 水酸化を行なう *Curvularia lunata* は同じ基質を $11\beta, 12\beta$ -エポキシドに変換できる。以上の事実から axial 水酸基を導入する酵素は、当該二重結合をエポキシドに導くことができると考えてよい。ステロイドのエポキシドはそれ以上代謝されないため、ステロイドの水酸化反応の中間体とはなり得ないといわれているが、多環芳香族炭化水素の代謝における中間体としてはエポキシドが知られている⁶³⁾。

* 副腎の 11β (axial)-水酸化酵素も $4^9(11)$ -体を $9\beta, 11\beta$ -エポキシドに導く⁶⁴⁾。

iv. アルコールのケトン・アルデヒドへの酸化

この反応は $\text{H}-\text{C}-\text{OH} + \text{NAD}^+ (\text{NADP}^+) \xrightleftharpoons{\text{酵素}} \text{>C=O} + \text{NADH} (\text{NADPH}) + \text{H}^+$ で示されるように、後述のカルボニル化合物のアルコールへの還元と可逆的關係にある。

ステロイド母核の 3α, 3β, 6β, 7α, 11β, 12α, 15β, 16α, 16β, 17β, 18, 20β-位のアルコールの酸化の報告があり、その他の化合物でも一般に見られる反応である。

v. ラクトン化 (Baeyer-Villiger 型反応) 微生物酵素による Baeyer-Villiger タイプ⁵⁸⁾の反応たとえば progesterone から testolactone への変換経路は下図に示す通りで、17-ケトンからラクトンへ変換される際、C₁₃-O-C₁₇ の酸素は空気中の酸素に由来することが ¹⁸O₂ とりこみ実験⁵⁹⁾により確かめられている。

17β-COCH₃ 体の 17β-OH あるいは 17-ケトン体への変換についてはかなり多数の報告があり、cortisol 系 (17β-COCH₂OH, 17α-OH) 化合物の 17-ケトンへの変換反応も若干見出されている。

表 3

基 質	生 成 ラ ン	微 生 物
R=OH	Δ ⁴	<i>Aspergillus tamaritii</i>
R=OH	Δ ^{1,4}	"
P=OH, A-nor	Δ ⁴ , A-nor	<i>Penicillium citrinum</i>
R=O	Δ ⁴	<i>Aspergillus tamaritii</i> , <i>Pythium ultimum</i>
R=β-COCH ₃	Δ ⁴	<i>Asp. flavus</i> , <i>Asp. oryzae</i> , <i>Asp. tamaritii</i> , <i>Cephalosporium subterricellatum</i> , <i>Cladosporium resinae</i> , <i>Collybia dryophila</i> , <i>Pen. adametzi</i> , <i>Pen. chrysogenum</i> , <i>Pen. lilacinum</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Cylindrocarpon radiculicola</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fus. solani</i> , <i>Pen. lilacinum</i>
R=β-COCH ₃ , 11α-OH	Δ ⁴ , 11α-OH	<i>Asp. flavus</i> , <i>Pythium ultimum</i>
R=β-COCH ₃ , α-OH	Δ ⁴	"
R=β-COCH ₂ OH	"	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium ultimum</i>
R=β-COCH ₂ OH, α-OH	"	<i>Curvularia lunata</i>
R=β-COCH ₂ OH, α-OH	Δ ^{1,4}	<i>Cylindrocarpon radiculicola</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i>

また camphor の環状ケトンが *Pseudomonas putia*⁶⁰⁾ によってラクトン化されるが、この酵素系が分離精製され⁶¹⁾、NADH を要求する monooxygenase であることが明らかにされている。

vi. スルフィドのスルホキシドへの酸化 下図のような酸化反応が知られているが、その機構については全く不明である。

vii. アミンのケトンへの酸化⁶⁷⁾ わづかに一例が知られているにすぎないが、興味深い反応である。

viii. 酸化的分解

a. ステロイド側鎖の開裂 生体内では、コレステロールから pregnenolone を経て C_{21} , C_{19} , C_{18} 系ステロイドホルモンが生成される。現在最も豊富なステロイド資源であるこのコレステロールの側鎖の開裂により、ステロイドホルモン合成中間体が得られれば誠に好都合であるが、通常の化学的酸化ではきわめて困難であり、ここに再び微生物変換が期待をになって登場することとなる。

Protoactinomyces erythropolis によりコレステノンなどが対応する etio 酸に酸化されることが見出されたのは 1948 年である⁶⁸⁾。その後 1964 にいたって *Nocardia* sp. によりコレステロールが、4-androstene-3,17-dione および 1,4-androstadiene-3,17-dione に酸化されることが認められたが得量ははなはだ不良であった⁶⁹⁾。

微生物によるステロイド母核の分解反応の主要経路の一つは、seco-phenol (後述芳香化反応参照) を経て進むことが最近の研究で明らかになったので、 C_9 - C_{10} の結合切断の起きる前に「側鎖の切断とA環の芳香化」が進行するような「基質と微生物の組合せ」を見出す努力がなされ、3,19-dihydroxy-5-cholestene acetate を基質とし CSD-10 菌を作用させると、72% の得量でエストロンが得られることが見出された⁷⁰⁾。コレステロールからの総得量(化学工程を含む)は 50% に達し、工業的生産への応用価値が充分認められる方法である。

最近わが国で開発され既に工業化されているコレステロールからエストロンの合成は、キレート剤(α , α -ジピリジル・ α -フェナンスロリンなど)を巧みに用いて、seco-phenol 形成のキーステップの一つである 9 α -水酸化を阻害させ、androst-4-ene あるいは androst-1,4-diene-3-17-dione を蓄積させる方法で、わが国のこの方面の高い実力を示すユニークな実例である⁷¹⁾。

なおこの微生物変換に応用できる微生物は, *Arthrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia*, *Streptomyces* 属に分布している。またこの方法でカンペストロール, β -シトステロール, スチグマステロールなどの植物ステロール(大豆ステロールとして多量に入手可能である)も androsta-1,4-diene-3,17-dione に変換される。このものは, 熱処理などによりエストロンに誘導することができる。一方ステロイドの側鎖にスピロケタルをもっている diosgenin に関して, *Fusarium solani*⁽⁷²⁾ による diosgenone の変換物として $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,16-dione (得量 65%), 16α -hydroxyandrosta-1,4-dien-3-one (得量 5%) および 16β -hydroxyandrosta-1,4-dien-3-one (得量 5%) を得ている。これらの側鎖開裂物は diosgenin から得られるが収量はきわめて少量である。多量にかつ安価に得られる diosgenin を原料として微生物変換によりもし一挙に好収量でステロイドホルモンを生産することができればきわめて価値があるものといえよう。

b. 芳香化反応 (Δ^1 -化と 9α -OH 化あるいは 19 -OH 化を経て逆アルドール縮合が起きる) 前述の Δ^1 -化は A 環の芳香化に直接関係しており, 3-keto- Δ^1 -19-nor-

steroid は Δ^1 -化されれば直ちにその A 環は芳香化し, また 3-keto- Δ^1 -9 α -hydroxysteroid も Δ^1 -化が起きれば逆アルドール縮合によりフォルムアルデヒドが脱離し, A 環は芳香化する。

9,10-seco-phenol 体の形成には 3-keto- Δ^1 -9-hydroxy 体が中間体として関与し, その逆アルドール縮合により生成すると考えられている。

表 5

基 質	生 成 物			
	A B 環	R ₂	R ₁ '	R ₂ '
R ₁ =O, Δ^4	O	O	O	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia restrictus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
R ₁ = β -OH, Δ^5	O	O	O	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
R ₁ = β -OH, Δ^5	O	O	OH	"
R=O, Δ^4	β -COCH ₃	β -COCH ₃	O	"

なおこの seco-phenol 体はステロイド母核の開裂分解の中間体と考えられており, 下図に示すように, この seco-phenol 体は更に 4-[3'-propionic acid]-7 α -methylperhydroindane-1,5-dione へ代謝され⁽⁷³⁾, あるいは 2-

表 4

基			生 成 物			微 生 物
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁ '	R ₂ '	R ₃ '
H	H	β -OH	H	H	=O	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Nocardia corallina</i> .
"	"	"	"	"	β -OH	<i>Arthrobacter simplex</i>
"	"	β -OAc	"	"	β -OAc	<i>Corynebacterium simplex</i>
"	"	"	"	"	=O	<i>Pseudomonas testosteroni</i>
	α -CH ₃	"	β -OH	CH ₃	"	"	<i>Septomyxa affinis</i>
	"	"	"	"	"	β -OH	"
	H	CH ₃	"	H	CH ₃	=O	"
	"	"	"	"	"	β -OH	"
	"	H	β -COCH ₃	"	H	β -OAc	<i>Corynebacterium simplex</i> , <i>Streptomyces lavendulae</i>

oxo-*cis*-4-hexenoic acid をへて DL-alanine に代謝されることが知られている⁷⁴⁾。

2. 還元反応 微生物変換反応においては、還元反応は一般に広く見られ、酸化反応と共に重要である。還元反応には、a) カルボニル化合物のアルコールへの還元 b) 二重結合の還元 c) ハロゲン化合物の還元などがある。

i. カルボニル化合物の還元 ステロイド系化合物を例にとれば 3,7,9 (seco 体について)、16,19,20,21-位のカルボニルの還元が報告されており、酵母は他の副反応が少ないのでよく用いられる。表6に出発原料(カルボニル化合物)・生成物・行なわれる変換反応・微生物を示してあるので参考にして頂きたい。

酵母は一般に α , β -不飽和 3-ケトン還元しにくいといわれているが、*Saccharomyces cerevisiae*⁷⁷⁾ を用いれば 5α -androst-1-ene-3,17-dione は 5α -androstane-3 β ,17 β -diol にまで還元される。またこの酵母は 5α -3-ケトンも 5β -3-ケトンも共に 3α -OH 体還元する点でも興味がある。

7-ケトンは 7α -OH 体へ *Streptomyces gelaticus*⁷⁸⁾, *Corynebacterium sp.*⁷⁹⁾ により還元されるが、この型の反応は胆汁酸系化合物の微生物変換反応でみられる。

9,10-seco 体の 9-ケトンは *Nocardia restrictus*⁸⁰⁾, *Mycobacterium sp.*⁸¹⁾ により 9α , 9β -OH 体へ導かれる。

Testosterone の *Wojnowicia grami*⁸²⁾, 4-estren-3-one の *Bacillus megaterium*⁸³⁾ の処理により 16-OH 体を得られるが、その生成には 16-ケトンの還元が関与していると考えられている。

17-ケトンの 17 β -OH 体への還元はさまざまな基質と微生物によって行なわれるが、17 α -OH 体への還元は非常に稀で、16,16-difluoro-17-ケトステロイド⁸⁴⁾の一例があるだけである。

20-ケトンは *Streptomyces sp.* により 20 β -OH 体還元され、*Streptomyces hydrogenans* から 20 β -hydrogenase が結晶⁸⁵⁾として得られている。20 α -OH 体への還元は *Rhodotorula longissima*⁸⁶⁾ などによって行なわれるが、この還元は酵母・藻類・むらさきうまごやしの芽生え、動物組織によって行なうことができる。

なお、単環および二環状ケトンの微生物 (*Mucor sp.*, *Curvularia sp.*, *Pseudomonas sp.* など) による還元反応については、かなり基礎的な研究が行なわれている。通常 *d*-体と *l*-体で、同一酵素による生成物が異なるので、その結果をまとめ、整理解析した「ダイヤモンド格子則」⁸⁷⁾ が提出されているが、これは反応の遷移状態にある基質の母核・置換基・酸素官能基(この場合便宜的に生成する水酸基を考える)をダイヤモンドの格子にあてはめ、これに補酵素の還元型ニコチン酸アミド環がどのように接近しその 4 位の水素を基質に供与し得るかによって、還元立体特異性があらわれるという考えに基

くものである。図はニコチン酸アミド(還元型)の 4S-H が基質の equatorial 位へ導入されるところを示しており、3 位のアミド基は立体障害を受けていない。この基質の対掌体の場合は、上の場合と全く同様に考えようとすると 3-位のアミド基は R_3 によって立体障害を受けることになり、このように反応が進まないことが理解できる。この仮説は立体化学の立場から酵素反応の特異性を解釈したユニークな例として、はなはだ興味深い。

また *d*-体と *l*-体によって、生成するアルコール体の立体的構造・得量などの種々の差が見られる例として、モルヒネ系アルカロイドの (+), (-)-codeinone および

(+), (-)-14-hydroxycodeinone の *Trametes sanguinea*¹⁸⁾ による還元反応が報告されている。

表 6

基 質	生 成 物	変 換 反 応	微 生 物 (得量)
estrone	estradiol 16 α -hydroxyestradiol	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH, 16 α -OH 化	Baker's yeast (67%), Press yeast (70%) Streptomyces halstedii ATCC 14399 Streptomyces mediodicidicus AT-CC 13278
<i>dl</i> -estrone	<i>d</i> -estradiol <i>l</i> -estrone	<i>d</i> -体のみ 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	Press yeast
8-aza-D-homoestrone 3-methyl ether	8-aza-D-homoestradiol 3-methylether (17 α , β -OH)	17 α -C=O $\rightarrow$ 17 α -OH 17 β -OH	Aspergillus ochraceus
androsta-1-ene-3, 17-dione	5 β -androstane-3 β , 17 β -diol 17 β -hydroxyandrost-1-en-3-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^1 : 還元 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	Baker's yeast (25%) Baker's yeast (83%)
17 β -hydroxyandrost-1-en-3-one	5 β -androstane-3, 17 β -diol	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^1 : 還元	Baker's yeast
androst-4-ene-3, 17-dione	testosterone 17 β -hydroxy-5 β -androstan-3-one 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH, 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^4 : 5 α 体へ還元	Yeast, Top yeast Clostridium lentoputrescens Clostridium lentoputrescens
androsta-1, 4-diene-3, 17-dione	17 β -hydroxyandrosta-1, 4-diene-3-one 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH 3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH, Δ^1 : 還元 Δ^4 : 5 β -H 体へ還元	Fusarium lateritium Clostridium paraputrificum
androst-5-ene-3, 17-dione	5 β -androstane-3 β , 17 β -diol	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH, 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^5 : 5 β -H 体へ還元	Top yeast
dehydroepiandrosterone	androst-5-ene-3 β , 17 β -diol	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	Clostridium lentoputrescens(67%) Yeast (18%)
3 α -hydroxyandrost-5-en-17-one	testosterone 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH (3 α -OH, Δ^5) $\rightarrow$ (3-C=O, Δ^4) 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^5 : 5 α -H 体へ還元	Baker's yeast (81%) Impoverished yeast Oxidizing bacteria Bacteria
3 α -hydroxyandrost-5-en-17-one 3-acetate	3 α , 17 β -dihydroxyandrost-5-ene 3-acetate	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	Yeast
3, 5-cycloandrosta-6, 17-dione	3, 5-cyclo-17 β -hydroxyandrost-6-one	17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	Yeast (50%)
testosterone	5 α -androstane-3 α , 17 β -diol 5 β -androstane-3 β , 17 β -diol	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH Δ^4 : 5 α -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元	Clostridium lentoputrescens Putrefactive bacteria (60%) Bacteria (14%)

基 質	生 成 物	変 換 反 応	微 生 物 (得量)
5 α -androstane-3, 17-dione	5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH 17-C=O $\rightarrow$ 17 β -OH	<i>Clostridium lentoputrescens</i> (35.5%) Top yeast
5 β -androstane-3, 17-dione	3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH	<i>Clostridium lentoputrescens</i> (36.4%)
Progesterone	3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one 3 β -hydroxy-5 β -pregnan-20-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元	<i>Alternaria bataticola</i> <i>Alternaria bataticola</i>
17 α -hydroxyprogesterone	3 α , 17 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one 3 β , 17 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元	<i>Alternaria bataticola</i> <i>Alternaria bataticola</i>
Progesterone	20 α -hydroxypregn-4-en-3-one 20 β -hydroxypregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Rhodotorula longissima</i> <i>Penicillium lilacinum</i> <i>Streptomyces lavendulae</i>
11 α -hydroxyprogesterone	11 α , 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Penicillium lilacinum</i>
16 α -hydroxyprogesterone	16 α , 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one 16 α , 20 β -dihydroxypregna-1, 4-dien-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH Δ^1 -形成	<i>Streptomyces lavendulae</i> <i>Streptomyces lavendulae</i>
11 β , 17 α -dihydroxyprogesterone	11 β , 17 α , 20 α -trihydroxypregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH	<i>Rhodotorula glutinis</i> (45%)
5 α -pregnane-3, 11, 20-trione	3 α -hydroxy-5 α -pregnane-11, 20-dione	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH	Yeast (44%)
5 β -pregnane-3, 11, 20-trione	3 α -hydroxy-5 β -pregnane-11, 20-dione	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH	Yeast (60%)
11 α -hydroxy-5 α -pregnane-3, 20-dione	3 β , 11 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-dione	3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH	Yeast (60%)
11-deoxycorticosterone	3 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnan-20-one 3 β , 21-dihydroxy-5 β -pregnan-20-one 20 β , 21-dihydroxypregn-4-en-3-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Alternaria bataticola</i> " " <i>Streptomyces</i> sp.
corticosterone	3 α , 11 β , 21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元	<i>Alternaria bataticola</i>
11-deoxycortisol	3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one 3 β , 17 α , 20-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one 3 β , 17 α , 21-trihydroxy-5 α -pregnan-20-one 17 α , 20 α , 21-trihydroxypregn-4-en-3-one 17 α , 20 β , 21-trihydroxypregn-4-en-3-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 β -H 体へ還元 3-C=O $\rightarrow$ 3 β -OH Δ^4 : 5 α -H 体へ還元 20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Alternaria bataticola</i> <i>Alternaria bataticola</i> <i>Streptomyces aureus</i> ATCC 3309 <i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 0395 (65%) <i>Candida pulcherrima</i> IFO 0964 <i>Curvularia lunata</i> NRRL 2380 <i>Didymella lycopersici</i> ATCC 11847 (5%) およびその胞子 <i>Epicoccum oryzae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pythium ultimum</i>

基 質	生 成 物	変 換 反 応	微 生 物 (得量)
	17 α , 20 β , 21-trihydroxypregna-1, 4-dien-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH 4 ¹ -形成	<i>Sporotrichum gougeroti</i> IFO 5982 (60~70%) <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Corynebacterium simplex</i> <i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Pseudomonas oleovarans</i>
1-dehydro-11-deoxycortisol	17 α , 20 α , 21-trihydroxypregna-1, 4-dien-3-one 17 α , 20 β , 21-trihydroxypregna-1, 4-dien-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH	<i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 0395 (80%) <i>Candida pulcherrima</i> IFO 0964 (40~80%) <i>Sporotrichum gougeroti</i> IFO 5982 (40~80%)
11-deoxycortisol	11 β , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxypregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH 11 β -OH 化	<i>Curvularia lunata</i>
19-hydroxy-11-deoxycortisol	17 α , 19, 20 α , 21-tetrahydroxypregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH	<i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 0395 (10%)
17 α , 21-dihydroxypregna-4, 6-diene-3, 11, 20-trione	17 α , 20 β , 21-trihydroxypregna-4, 6-diene-3, 11-dione	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Curvularia lunata</i> NRRL 2380 (20~25%)
17 α , 21-dihydroxypregna-4, 9(11)-diene-3, 20-dione	17 α , 20 β , 21-trihydroxy-9 β , 11 β -oxidopregn-4-en-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH 9 β , 11 β -epoxide 形成	<i>Curvularia lunata</i>
Cortisone	3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnane-11, 20-dione 17 α , 20 β , 21-trihydroxypregn-4-ene-3, 11-dione 3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-20-one 11 β , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxypregn-4-en-3-one	3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH 4 ¹ : 5 β -H 体へ還元 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH 3-C=O $\rightarrow$ 3 α -OH 4 ¹ : 5 β -H 体へ還元 20-C=O $\rightarrow$ 20 β -OH	<i>Alternaria bataticola</i> <i>Catenabacterium catenaeforme</i> <i>Fusarium solani</i> var. <i>eumartii</i> <i>Gloeosporium olivarum</i> <i>Alternaria bataticola</i> <i>Streptomyces hydrogenans</i>
16 α , 17 α -oxidoprogesterone	17 β -methyl-16 α , 20 α -dihydroxy-18-nor-17 α -pregna-4, 13(14)-dien-3-one	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 16 α , 17 α -epoxide $\rightarrow$ 開環 18-CH ₃ $\rightarrow$ 17 β へ転移	<i>Yeast</i> 60%
16 α , 17 α -oxidopregnenolone	17 β -methyl-18-nor-17 α -pregna-5, 13(14)-diene-3 β , 16 α , 20 α -triol	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 16 α , 17 α -epoxide $\rightarrow$ 開環 18-CH ₃ $\rightarrow$ 17 β へ転移	<i>Yeast</i> 20%
16 α , 17 α -oxido-5 β -pregnane-3, 20-dione	17 β -methyl-16 α , 20 α -dihydroxy-18-nor-5 β -pregn-13(14)-en-3-one 17 β -methyl-18-nor-5 α -pregn-13(14)-ene-3 β , 16 α , 20 α -triol	20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 16 α , 17 α -epoxide $\rightarrow$ 開環 18-CH ₃ $\rightarrow$ 17 β へ転移 20-C=O $\rightarrow$ 20 α -OH 16 α , 17 α -epoxide $\rightarrow$ 開環 18-CH ₃ $\rightarrow$ 17 β へ転位 5 β -H $\rightarrow$ 5 α -H	<i>Yeast</i> <i>Yeast</i>

ii. 二重結合の還元 二重結合も諸種の微生物によって還元され、とくに 3-ケトンに共役した 4¹ が還元される例が多い。*Streptomyces* 属は prednisone に作用すると 17 α , 21-dihydroxypregn-1-ene-3, 17, 20-trione を得ることから 4¹ のみが水素化されたことになり興味がある。3-hydroxy-4¹ の還元においては、導入される C₅ の水素原子の方向に対して側鎖が影響をおよぼしている。一般に糸状菌により 4¹-progesterone 系では 5 α -あるいは 5 β -ジヒドロ体⁸⁹⁾が得られる。その他 *Noc-*

*ardia restrictus*⁸⁹⁾ による 17 β -hydroxyandrosta-4, 6-diene-3-one の 4⁶ の二重結合の還元 の例もある。一方 codeinone の二重結合の還元については, *Trametes sanguinea*¹⁸⁾ により (+)-codeinone から (+)-dihydrocodeinone を生成するが, (-)-codeinone からはジヒドロ体が得られない, それ故に基質の絶対構造特異性が認められる。

iii. ハロゲン化合物の還元 *Cylindrocarpus radicola* により 9 α -bromo-11-ketoprogesterone は, 4¹-de-

hydro-11-ketotestolactone に変換 (9 α -bromo の還元, 4 1 -化, 側鎖の脱離, D 環ラクトン化) される⁹⁰⁾。ハロゲン化合物の還元は例はきわめて稀である。

3. その他の反応 以上酸化と還元について述べてきたが, ほかに下記のような種々の反応が知られている。エステル化・アミドの形成・加水分解・二重結合の異性化・ハロゲン化・エポキシドの加水分解 (ジオールの生成)・エポキシドのプロトン化により誘起される Wagner-Meerwein 転移・脱炭酸・脱水・アミノ化, などの報告がみられるが, ここではステロイドの二重結合の異性化, ハロゲン化, 加水分解, エステル化について簡単に述べる。

4. 異性化反応 4 $^5(6)$ -および 4 $^5(10)$ -3-ketosteroid を 4 1 -3-ketosteroid にする変換は広く微生物に分布していることが知られている。最近動物組織⁹¹⁾からも 4 5 -3-ketosteroid isomerase が分離されたが, *Pseudomonas testosteroni*⁹²⁾ からは 4 5 -3-ketoisomerase が結晶化されている。これは単一な結晶形をもち, 沈降常数 $S_{20,w} = 3.3S$, 分子量 40,800 である。この酵素のアミノ酸組成は His. 9, Tyr. 10, Meth. 10, *i*-Leu. 11, Lys. 13, Pro. 15, Ser. 6, Arg. 22, Thre. 23, Phe. 25, Leu. 25, Gly. 28, Glu. 37, Asp. 39, Val. 40, Ala. 66 で Cysteine (cystin) および Tryptophane は存在しない。4 5 -androstene-3, 17-dione の異性化反応の最大速度は pH 7.0, 25°C の条件下で, $17.3 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$, Michaelis 常数は $320 \mu\text{M}$ である。酵素は 4 5 -pregne-3, 20-dione に作用するが, 4 5 -cholesten-3-one には作用しない。4 $^5(10)$ -19-norsteroid 類は 4 5 -androstene-3, 17-dione の 0.25~0.75% の割合で異性化される。4 5 -androstene-3, 17-dione⁹³⁾ を D $_2$ O あるいは $^3\text{H}_2\text{O}$ 下でこの酵素により異性化反応を行なわせると, 生成物にはほとんど D ^3H が含まれていない。一方⁹⁴⁾ C-4 と C-6 に重水素でラベルしたステロイドを用いての異性化反応を立体化学的に解析した結果, 4 5 -3-ケトンの 4 β -プロトンが, 6 β 位に導入される。すなわち axial から axial へ立体特異的に移動することが明らかになっている。この異性化の際酵素の acidic site はカルボニルの酸素へプロトンを供給し, basic site は 4 β -プロトンを受容し中間体として 4 $^5(10)$ -dienol を形成する。さらに 4 β -プロトンを受容した basic site は 6 β 位にプロトンをわたす。

5. ハロゲン化反応 微生物によるステロイドのハロゲン化反応についての報文は非常に少なく, *Caldariomyces fumago*⁹⁵⁾ によるステロイドの C-17 α 位の塩素あるいは臭素化, または C-16 位の臭素化反応が報告されているにすぎない。

6. 加水分解反応 C-3 および C-21-acetoxy 基の加水分解反応は一般に微生物の副変換反応と考えられる。C-11 β , C-21-diacetoxy 化合物の場合は, 11 β 位は加水分解されるが, C-21 位はされない⁹⁶⁾。11 β , 21-diacetoxy-9 α -bromo-17 α -hydroxy-pregna-1, 4-diene-3, 20-dione の化学的処理により三員環化合物 (1) を合成し, この化合物 (1) を *Flarobacterium dehydrogenaus* により C-11 β -acetoxy 基を加水分解し, 1 β , 11 β -エーテル環化合物 (2) を得ている例もある⁹⁷⁾。また *Calonectria decora* により 7 α -methylthioandrost-4-ene

-3-one の C-17 acetoxy 基が加水分解される例も報告されている⁹⁸⁾。ステロイドのエステル分解酵素に関して, *Nocardia restrictus* より従前分離されたものよりも 70 倍も高い活性を有する esterase が分離されている⁹⁹⁾。この酵素は propionate, succinate および benzoate ester に対して作用せず, ステロイドの acetoxy 基の位置に選択的に作用することで興味がある。C-21, C-20, C-17 (第二級), C-16 α , C-15 α , C-6 α , C-3 (A : B 環トランス), C-2 β および C-19 位の acetoxy 基は遊離のアルコールに加水分解されるが, ほかの acetoxy 基は加水分解に対し抵抗性がある。

7. エステル化反応 微生物によるステロイドのエステル化反応に関しては、近年報文がみられるようになってきた。*Saccharomyces fragilis* ATCC 1022¹⁰⁰⁾ は 4^1 -androstene-3,17-dione の C-17 ケト基の還元と同時にアセチル化して testosterone-17-acetate を与える。*Trichoderma glaucum* No-2-696¹⁰¹⁾ は 9α -fluoro-11 β ,21-dihydroxy-16 α ,17 α -isopropylidenedioxy-pregn-4-ene-3,20-dione (1) を C-21-アセチル体に変換する。

8. 応用例について さて微生物変換を単位反応として応用し、成果をあげ得たわれわれに身近かな例の2,3をあげて読者の御参考供したい。

i. 光学活性な生理活性物質の全合成への応用例 前述の11-水酸化、 4^1 -化、コレステロールの側鎖の切断などは、微生物変換の実用上の応用例として際立って有名であるが、いずれも光学活性の天然物を基質としたものである。最近のステロイド全合成研究の進歩により、ステロイドホルモン特に19-nor系は全合成の時代に入ろうとしているが、その際の隘路は光学活性の問題で、通常の化学的手法ではなかなかその解決が困難である。しかし下図に示すように、中間体合成の途中に酵素の非常に高度な反応特異性を利用すればこの問題は一挙に解決される。

この場合特に付言しておきたいことは、1個所の選択的還元により2個の不整が導入され基質の利用が理論的には100%可能であることである。

ii. 不安定な物質の生理的な緩和な条件下の変換の応用例 サボゲニンのアグリコンの構造研究の際に、アグリコン部のみを得るため、化学的加水分解法を用いる

と、不安定な官能基が変化を起し、目的を充分達し得ない場合がある。その危険を避けるため、目的に適する加水分解菌を土壌等から分離して、非常に好結果を得ている例が最近報告されている¹⁰³⁾。

iii. 化学的には導入困難な位置に官能基を導入する手段として、微生物変換を応用した例

a. helvolic acid と fusidic acid の相互関連づけ¹⁰⁴⁾ ステロイド型抗生物質である fusidic acid (X線構造解析がなされている) と helvolic acid の相互関連づけには fusidic acid の7位に酸素官能基を導入せねばならず、化学的には困難なので *Acrocyndrium oryzae* を用いて目的を果している。

表 7

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	その他
fusidic acid	α -OH β -H	H	H ₂	OH	
helvolic acid	O	OAc	O	H	4^1

b. sugeonol と cyperotundone の相互関連づけ¹⁰⁵⁾

Cyperus rotundus Linné のセスキテルペン的一种である sugeonol の構造研究のため cyperotundone の化学的変換により sugeonol に導こうとしたが成功しなかった。しかし、微生物変換により目的を達することができた。

c. コレステロールの C-20 位のプロトンの基源の証明¹⁰⁶⁾

コレステロールの20位のプロトンの基源を直接証明するためには、この位置のプロトンを目的に応じて脱離できるように、C₂₁あるいはC₂₂にカルボニルを導入することが必要であった。母核を損うことなくこのような位置

のように、C₂₁あるいはC₂₂にカルボニルを導入することが必要であった。母核を損うことなくこのような位置

に酸素官能基を導入するには、微生物変換の応用が適当で、*Tetrahymena pyriformis* を用いればコレステロールの 4^1 , 4^{22} に二重結合を導入することができる。 4^5 を trisphenylphosphine rhodium で選択的に還元した後、定量的オゾン分解により、22-CHO 体へ導くことができる。(4R) [4- 3 H, 2- 14 C]-MVA と肝臓の酵素系を用いて生合成した二重ラベルのコレステロールを上記の反応にかけて、得られるアルデヒドの 20 位からトリチュームを脱離させ、MVA の 4R- 3 H が確かにコレステロールの 20 位に存在していることを証明した。

おわりに

副腎皮質ホルモンのような絶好の目標が再びあらわれれば、非常に多くの微生物変換研究が集中的になされ、その結果多くの重要な知見が蓄積されることは疑いない。そうでなくても、もし有機化学者が微生物あるいは酵素に親近感を持って、必要に応じてためらうことなくこの小さな生物を活用されるならば、微生物・醗酵学の専門家達の気づかないおもしろい現象や有用な反応が見出されるのではないかと期待している。

なお、紹介できなかった多くの反応、ぼう大な反応例を検討なさるには、下記の総説・モノグラフを参照して頂きたい。

(総説) Ch. Tamm, "Umwandlung von Naturstoffen durch mikrobielle Enzyme" *Angewante Chemie* **74** 225 (1962)

津田恭介, "ステロイドおよびアルカロイドの微生物変換" *工業化学雑誌* **67** 657 (1964)

(モノグラフ)

Hiroshi Iizuka, Atsushi Naito, "Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids" University of Tokyo Press & University Park Press (1967)

William Charney, H.L. Herzog: "Microbial Transformation of Steroids" Academic Press (1967)

(昭和 45 年 3 月 2 日受理)

文 献

- 高橋雅弘, 日野哲雄, 奥村信二, 三浦八十治, 石田守良, *Amino Acids* No. 7 23 (1963)
- P.D. Meister, A. Weintraub, *USP* 2,877,162 (1959)
- E.L. Dulaney, *Mycologia* **47** 464 (1955)
- M. Okada, A. Yamada, M. Ishidate, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **8** 530 (1960)
- H. Ishii, Y. Nozaki, T. Okumura, D. Sato, *J. Pharm. Soc. (Japan)* **81** 805 (1961); Y. Nozaki, E. Masuo, H. Ishii, T. Okumura, D. Sato, *Ann. Rept. Shionogi Res. Lab.* **11** 9 (1961); Y. Nozaki, E. Masuo, D. Sato, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **26** 399 (1962)
- Ch. Tamm, A. Gubler, *Helv. Chim. Acta* **42** 473 (1959)
- A. Krámlí, J. Horváth, *Nature* **162** 619 (1948)
- C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong, K.C. Wang, F.N. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **87** 2765 (1965)
- Y. Sato, S. Hayakawa, *J. Org. Chem.* **28** 2742 (1963)
- S.M. Kupchan, C.J. Sih, S. Kubota, A.M. Rahin, *Tetrahedron Letters* No. **26** 1767 (1963)
- Y. Sato, S. Hayakawa, *J. Org. Chem.* **28** 2739 (1963)
- Y. Sato, S. Hayakawa, *J. Org. Chem.* **29** 198 (1964)
- J.A. Moore, W.H. Holton, E.L. Wittle, *J. Am. Chem. Soc.* **84** 390 (1962)
- W.O. Godtfredsen, G. Korsby, H. Lorck, S. Vangedal, *Experientia* **14** 88 (1958)
- S.C. Pan, E.L. Weisenborn, *J. Am. Chem. Soc.* **80** 4749 (1958)
- R.E. Hartman, E.F. Krause, W.W. Andres, E. L. Patterson, *Appl. Microbiology* **12** 138 (1964)
- A. Brack, R. Brunner, H. Kobel, *Helv. Chim. Acta* **45** 276 (1962)
- K. Tsuda, *Chemistry of Microbial Products* (6th Symposium of The Inst. Appl. Microbiology, Univ. of Tokyo) (1964) p. 167
- M. Tocko, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. biol.* **11** 161 (1963)
- W.H. Bradshaw, H.E. Conrad, E.J. Corey, I. C. Gunsalus, D. Lednicer, *J. Am. Chem. Soc.* **81** 5507 (1959)
- P.K. Bhattacharyya, B.R. Prema, B.D. Kulkarni, S.K. Pradhan, *Nature* **187** 689 (1960)
- B. Pfrunder, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **52** 1643 (1969)
- M. Hayano, A. Sato, D. Stone, R.I. Dorfman, *Biochim. Biophys. Acta* **21** 380 (1956); Y. Kurosawa, M. Hayano, M. Gut, R.I. Dorfman, A. Schubert, C.A. Bunton, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **25** 424 (1961)
- M. Hayano, M. Gut, R.I. Dorfman, O.K. Sebek, D.H. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **80** 2336 (1958); E.J. Corey, G.A. Gregoriou, D.H. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **80** 2338 (1958)
- B. Witkop, 金岡祐一, "NIH シフト" 化学の領域 **23** 949 (1969)
- D.R. Brannon, F.W. Powish, B.J. Wiby, L. Lony, Jr., *J. Org. Chem.* **23** 1521 (1967)
- B.M. Bloom, G.M. Shull, *J. Am. Chem. Soc.* **77** 5767 (1955)
- M. Hayano, A. Saito, R.I. Dorfman, *Proc. Int.*

- Symp. Enzyme Chem.* (Tokyo & Kyoto 1957) p. 204
- 29) F.N. Chang, C.J. Sih, *Biochem.* **3** 1551 (1964)
- 30) T. Kimura, K. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20** 373 (1965); T. Omura, E. Sanders, R.W. Estabrook, D.Y. Cooper, O. Rosenthal, *Arch. Biochem. Biophys.* **117** 660 (1966)
- 31) T. Omura, E. Sanders, D.Y. Cooper, R.E. Estabrook, *Meth. Enzymol.* **10** 362 (1967)
- 32) T. Kimura, K. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **242** 485 (1966)
- 33) T. Kimura, K. Suzuki, T. Omura, D.Y. Cooper, R.W. Estabrook, *Int. Congr. Biochem. Abst. XIII-4*, 561 (1967)
- 34) B.W. Harding, S.H. Wong, D.H. Nelson, *Biochim. Biophys. Acta* **92** 415 (1964)
- 35) M. Katagiri, B. Ganguli, I.C. Gunsalus, *Fed. Proc. No. 2* 525 (1968)
- 36) Y. Nakamura, H. Otsuka, B.I. Tamachi, *Biochim. Biophys. Acta* **122** 34 (1966)
- 37) J. Horvath, A. Kramli, *Nature* **160** 639 (1947); *Arch. Biol. Hung.* [2] **18** 19 (1948)
- 38) J. Fried, R.W. Thoma, A. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75** 5764 (1953)
- 39) A. Nobile, W. Charney, P.L. Perlman, H.L. Herzog, C.C. Payne, M.E. Tully, M.A. Jevnik, F.B. Hersherberg, *J. Am. Chem. Soc.* **77** 4184 (1955)
- 40) T.H. Stoudt, W.J. McAleer, J.M. Chemerda, M.A. Kozlowski, R.F. Hirshmann, V. Marlatt, R. Miller, *Arch. Biochem. Biophys.* **59** 304 (1955)
- 41) H.A. Kroll, J.F. Pagano, R.W. Thoma, *USP* **2**, 822, 318 (1958)
- 42) R.C. Meeks, P.D. Meister, S.H. Eppstein, J. P. Rosselet, A. Weintraub, H.C. Murray, O.K. Sebek, L.M. Reineke, D.H. Peterson, *Chem. & Ind.* 391 (1958)
- 43) E. Kondo, E. Masuo, *J. Gen. Appl. Microbiology (Tokyo)* **7** 113 (1961)
- 44) E. Vischer, A. Wettstein, *Experientia* **9** 371 (1955)
- 45) T.H. Stoudt, W.J. McAleer, M.A. Kozlowski, V. Marlatt, *Arch. Biochem. Biophys.* **74** 280 (1958)
- 46) C. Coronelli, D. Kluephel, P. Sensi, *Experientia* **20** 208 (1964); D. Kluepfel, C. Coronelli, *Experientia* **18** 441 (1962)
- 47) S. Hayakawa, Y. Saburi, I. Akaeda, *J. Biochem. (Tokyo)* **44** 109 (1957); S. Hayakawa, Y. Saburi, K. Tamaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **45** 419 (1958); K. Tamaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **45** 693 (1958)
- 48) A.I. Laskin, J. Fried, *USP* **3**, 115, 443 (1963)
- 49) H.L. Herzog, M.J. Gentles, A. Basch, W. Coscarelli, M.E.A. Zeitz, W. Charney, *J. Org. Chem.* **25** 2177 (1960)
- 50) E. Titus, A.W. Murray, H.E. Spiegel, *J. Biol. Chem.* **235** 3399 (1960)
- 51) H.R. Levy, P. Talalay, *J. Am. Chem. Soc.* **79** 2658 (1957); *J. Biol. Chem.* **234** 2009 (1959), 2014 (1959)
- 52) S.J. Davidson, P. Talalay, *Federation Proc.* **23** 275 (1964)
- 53) P.H. Gale, A.C. Page, Jr., T.H. Stoudt, K. Folkers, *Biochem.* **1** 788 (1962)
- 54) M. Iida, J.D. Townsley, M. Hayano, H.J. Brodie, *Steroid Suppl.* **1** 159 (1965)
- 55) M. Hayano, H.J. Ringold, V. Stefanovic, M. Gut, R.I. Dorfman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4** 454 (1961)
- 56) H.J. Ringold, M. Hayano, V. Stefanovic, *J. Biol. Chem.* **238** 1960 (1963)
- 57) R. Jerussi, H.J. Ringold, *Biochemistry* **4** 2113 (1965)
- 58) J. Fried, R.W. Thoma, A. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75** 5764 (1953); D.H. Peterson, S. H. Eppstein, F.D. Meister, H.C. Murray, H.M. Leigh, A. Weintraub, L.M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.* **75** 5768 (1953)
- 59) R.L. Prairie, P. Talalay, *Biochemistry* **2** 203 (1963)
- 60) W.H. Bradshaw, H.E. Conrad, E.J. Corey, I. C. Gunsalus, D. Ledenice, *J. Am. Chem. Soc.* **81** 5507 (1959); H.E. Conrad, R. DuBus, I.C. Gunsalus, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **6** 293 (1961)
- 61) C.A. Yu, I.C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **244** 6149 (1969)
- 62) B.M. Bloom, G.M. Shull, *J. Am. Chem. Soc.* **77** 5767 (1955)
- 63) E. Boyland, P. Sims, *Biochem. J.* **77** 175 (1960)
- 64) Y. Kurosawa, M. Hayano, B.M. Bloom, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **25** 838 (1961)
- 65) C.E. Holmlund, K.J. Sax, B.E. Nielsen, R.E. Hartman, R.H. Evans, Jr., R.H. Blank, *J. Org. Chem.* **27** 1468 (1962)
- 66) R.M. Dodson, N. Newman, H.M. Tsuchiya, *J. Org. Chem.* **27** 2707 (1962)
- 67) J. Fried, R.W. Thoma, A. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75** 5764 (1953)
- 68) G.E. Turfitt, *Biochem. J.* **42** 376 (1948)
- 69) J.M. Whitmarch, *Biochem. J.* **90** 23 p (1964)
- 70) C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong, K.C. Wang, F.N. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **87** 2765 (1965)
- 71) K. Arima, M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, *Agr. Biol. Chem.* **33** 1636 (1969); M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, K. Arima, *Agr. Biol. Chem.* **33** 1644 (1969)
- 72) E. Kondo, T. Mitsugi, *J. Am. Chem. Soc.* **88** 4737 (1966)
- 73) C.J. Sih, K.C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **85**

- 2135 (1963)
- 74) A.W. Coulter, P. Talalay, *J. Biol. Chem.* **243** 3238 (1968)
- 75) R.M. Dodson, R.D. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **83** 4627, **80** 5004 (1958)
- 76) K. Schubert, K.-H. Böhme, C. Hörbold, *Z. Naturforsch.* **15b** 584 (1960), **16b** 595 (1961)
- 77) A. Butenandt, H. Dannenberg, L.A. Suranyi, *Ber.* **73** 818 (1940)
- 78) B. Camerino, C.G. Alberti, A. Vercellone, *Helv. Chim. Acta* **36** 1945 (1953)
- 79) S. Hayakawa, Y. Saburi, H. Hoshijima, *J. Biochem. (Tokyo)* **45** 465 (1958)
- 80) K. Tamaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **45** 693 (1958)
- 81) K.C. Wang, C.J. Sih, *Biochemistry* **2** 1238 (1963)
- 82) H. Herzog, M.J. Gentles, A. Basch, W. Coscarelli, M.E.A. Zeit, W. Charney, *J. Org. Chem.* **25** 2177 (1960); R.M. Dodson, S. Mizuba, *J. Org. Chem.* **27** 698 (1962)
- 83) K.J. Sax, R.H. Blank, R.H. Evans, Jr., L.I. Feldman, C.E. Holmlund, *J. Org. Chem.* **29** 2351 (1964)
- 84) C.H. Robinson, N.F. Bruce, E.P. Oliveto, *J. Org. Chem.* **28** 975 (1963)
- 85) H.J. Hübener, F.G. Sahrholz, J. Schmidt-Thome, G. Neemann, R. Junk, *Biochim. Biophys. Acta* **35** 270 (1959); G. Neemann, H.J. Hübener, J. Schmidt-Thome, *Biochem. Z.* **236** 329 (1962); J. Schmidt-Thome, G. Neemann, H.J. Hübener, I. Alester, *Biochem. Z.* **336** 322 (1962)
- 86) F. Carvajal, O.F. Vitale, M.J. Gentle, H.L. Herzog, E.B. Hershsberg, *J. Org. Chem.* **24** 695 (1959)
- 87) V. Prelog, IUPAC Symposium (Kyoto, 1964) "Chemistry of Natural Products 3" Butterworth (1964) p. 119
- 88) R.M. Dodson, R.D. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **83** 4631 (1961)
- 89) Y.Y. Tsong, K.C. Wang, C.J. Sih, *Biochim. Biophys. Acta* **93** 398 (1964)
- 90) A.I. Laskin, P.A. Diassi, *Federation Proc.* **22** 354 (1963)
- 91) H.L. Krüskember, E. Forchielli, H.J. Ringold, *Steroid* **3** 295 (1964); W. Ewald, H. Werbin, I.L. Chaikoff, *Biochim. Biophys. Acta* **81** 199 (1964)
- 92) F.S. Kawahara, P. Talalay, *J. Biol. Chem.* **235** pc 1 (1960); F.S. Kawahara, S.-F. Wang, P. Talalay, *J. Biol. Chem.* **237** 1500 (1962)
- 93) P. Talalay, V.S. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **18** 300 (1955)
- 94) H.J. Ringold, S.K. Malholta, "Abst. 6th. Intern. Congr. Biochem." New York, 1964 IV 329
- 95) S.L. Neidleman, P.A. Diassi, B. Junta, R.M. Palmere, S.C. Pan, *Tetrahedron Letters* No. **44** 5337 (1966)
- 96) W. Charney, L. Weber, E. Oliveto, *Arch. Biochem. Biophys.* **79** 402 (1959)
- 97) O. Gnoj, E.P. Oliveto, C.H. Robinson, D.H. Robinson, D.H.R. Barton, *Proc. Chem. Soc.* 207 (1961)
- 98) C.E. Holmlund, K.J. Sax, B.E. Nielsen, R.E. Hartman, R.E. Evans, Jr., R.H. Blank, *J. Org. Chem.* **74** 1468 (1962)
- 99) C.J. Sih, J. Lavae, M.A. Rahim, *J. Biol. Chem.* **238** 556 (1963)
- 100) J.S. McGuire, E.S. Maxwell, G.M. Tomkins, *Biochim. Biophys. Acta* **45** 392 (1960)
- 101) C.E. Holmlund, L.I. Feldman, N.E. Ringler, B.E. Nielsen, R.H. Evans, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **83** 2586 (1961)
- 102) H. Gibian, K. Kieslich, H.-J. Koch, C. Rufer, E. Schröder, R. Vossing, *Tetrahedron Letters* **21** 2321 (1966); H. Kosmol, K. Kieslich, R. Vössing, H.-J. Koch, K. Petzoldt, H. Gibian, *Ann.* **701** 198, 205 (1967)
- 103) 吉岡一郎, 西条成良, 北川勲, J.A. Water, 日本薬学会第89年会要旨集 p. 356 (1969年4月)
- 104) W. Daehne, H. Lorch, W.G. Godtfredsen, *Tetrahedron Letters* 4843 (1968)
- 105) H. Hikino, K. Aoto, Y. Tokuoka, T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.* **16** 1088 (1968)
- 106) E. Caspi, L.J. Mulheirn, *Chem. Commun.* 1423 (1969)