

Curvularia 属菌による Progesterone の変換反応¹⁾

古川 宏, 安藤正彦, 古川秀之

名城大学薬学部²⁾

Microbial Transformations of Progesterone by a *Curvularia* Species¹⁾

HIROSHI FURUKAWA, MASAHIKO ANDO, and HIDEYUKI FURUKAWA

Faculty of Pharmacy, Meijo University²⁾

(Received June 13, 1978)

Microbial transformation of progesterone(I) was attempted by *Curvularia lunata* IFO (5997). 1-Dehydroprogesterone(IV), androsta-1,4-diene-3,17-dione(V), 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione(VIII), 3,17 β -dihydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9-one(IX), and 15 β -hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione(VI) were isolated and characterized.

Keywords—microbial transformations; *Curvularia*; progesterone; pregna-1,4-diene-3,20-dione; androsta-1,4-diene-3,17-dione; 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione; 3,17 β -dihydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9-one; 15 β -hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione

微生物によるステロイド代謝の研究は、1973年 Neuberger 一門の Mamoli ら³⁾ が酵母によるアンドロスタン系ステロイドの変換反応を行なって以来、今日までに数多くの研究が行なわれ、いくつかの成書にもまとめられている。⁴⁾

今回、我々は供試菌株として、新しく *Curvularia lunata* IFO (5997) 株を入手しえたので、この菌株を用いて progesterone (I) の変換反応を試みたところ、今日まで同属菌株の代謝物としては知られていなかった代謝生成物を単離し確認することができたので報告する。

Curvularia 属菌による progesterone (I) の代謝産物としては、1955年 Shull ら⁵⁾ により 11 β -hydroxy 体が証明されたのをはじめとして、14 α -、21-hydroxy 体、6 β 、14 α -、7 α 、14 α -、11 β 、14 α - および 11 β 、21-dihydroxy 体が知られている。⁴⁾

今回我々は、Shull ら⁵⁾ が *C. lunata* の醗酵に際し、休止菌体を用いる方法により好結果をえていることに注目し、同様の方法により培養を行なった。

すなわち、供試菌株 *C. lunata* IFO (5997) を馬鈴薯斜面寒天上培養、増殖させ、ついで麹汁に接種し、通気培養を行ない、菌を十分に発育させたのち、ろ過、水洗、圧搾してえた菌体を、実験の部に詳述した無機塩類のみを溶かした滅菌蒸留水中に入れ、ついで少量のエタノールに溶かした基質 progesterone (I) を加え、室温で通気攪拌を行なった。醗酵終了後遠心分離して上澄み液と菌体とに分け、前者はクロロホルムで、後者はアセトン、クロロホルム混液で抽出したのち両者を合せて溶媒を留去し、残渣に少量のエタノールを加え、不溶物を除去したのち、実験の部に詳述するように可溶部をシリカゲルクロマト、および preparative 薄層クロマトにより分離、精製し、7種類の代謝物 (A, B, ..., G) を単離し、その構造研究を行なった。

まず、代謝物Aは主代謝生成物であり、mp 152—154°, $[\alpha]_D + 119^\circ$ (クロロホルム) の無色針状結晶としてえら

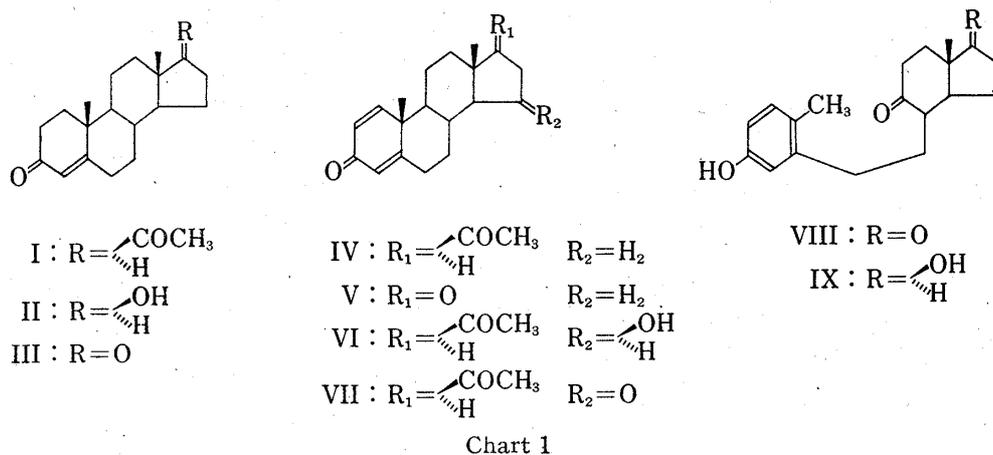
1) 本研究の一部は日本薬学会第98年会(岡山, 1978年4月)において発表した。

2) Location: Yagoto, Tempaku, Nagoya 468, Japan.

3) L. Mamoli, A. Vercellone, *Ber.*, **70**, 470 (1973).

4) W. Charney, H.L. Herzog, "Microbial Transformations of Steroids, a Handbook," Academic Pr., New York, 1967; A.A. アフレム, Yu. A. チトフ, "ステロイドと微生物," (伊藤一男訳), 廣川書店, 東京, 1974; H. Iizuka, A. Naito, "Microbial Transformations of Steroids and Alkaloids," Univ. Tokyo Pr., 東京, 1967.

5) G.M. Shull, D.A. Kita, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 763 (1955).



れ、プロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトルにおいて、 δ 0.70, 1.23 および δ 2.09 にそれぞれ 3H singlet を示し、これらは基質 progesterone (I) から予想されるように、 C_{18} -, C_{19} -メチル基、および C_{21} -アセチルメチル基によるものと考えられる。また、ビニルプロトン領域においては、 δ 6.00 に巾広い 1H singlet, δ 6.14 に $J=2$, および 10 Hz の 1H doublet-doublet, δ 6.95 に $J=10$ Hz の 1H doublet が観察された。また赤外線吸収 (IR) スペクトルにおいては、 1693 cm^{-1} に progesterone (I) と同じく C_{20} -カルボニル基にもとづく吸収を示すほか、 $1655, 1616, 1600\text{ cm}^{-1}$ に吸収を有している。さらに紫外線吸収 (UV) スペクトルにおいては、 244 nm に極大吸収を示すことより、本代謝物は 1,4-diene-3-one の部分構造を有することが明らかとなった。また質量スペクトル (MS) では m/e 312 に分子イオンピークを示すほか、 m/e 227, 122 に特徴的なフラグメントピーク⁶⁾ がみられ、これらのデータより本化合物は 1-dehydroprogesterone (pregna-1,4-diene-3,20-dione) (IV) と推定された。そこで Sondheimer らの文献^{7a)} にしたがって progesterone (I) を 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) で処理してえられる化合物 IV^{7b)} と比較し、同一物質であることを確認した。

つぎに、代謝物 B は mp $138\text{--}140^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +113^\circ$ (クロロホルム) の無色針状結晶としてえられ、その ^1H NMR スペクトルは δ 0.96, 1.27 にそれぞれ singlet として、 C_{18} -, および C_{19} -メチル基のシグナルを示すが、基質にみられたアセチルメチル基にもとづくシグナルは認められない。また C_{18} -メチル基のシグナルが基質 I のそれに比して 0.27 ppm 低磁場にみられること、および IR スペクトルで新たに 1725 cm^{-1} に 5 員環ケトンの強い吸収がみられることより、本化合物は C_{17} -ケト体であると予想される。さらに ^1H NMR スペクトルのビニルプロトン領域には、IV と同様 ABX 型のシグナル (δ 6.07 (br.s.), δ 6.22 (d.d., $J=2, 10$ Hz), δ 7.02 (d, $J=10$ Hz)) がみられること、IR スペクトルで $1655, 1615, 1600\text{ cm}^{-1}$ に吸収をもつことから、本代謝物も IV と同様 1,4-diene-3-one の部分構造をもつ androsta-1,4-diene-3,17-dione (V)⁸⁾ と推定されたので、実験の部に詳述するように testosterone (II) を DDQ で脱水素したのち、ピリジン中無水クロム酸で酸化してえた標品 V⁸⁾ と比較し、同定した。

つぎに黄色油状の代謝物 C は、そのシリカゲル薄層クロマトにおいて、基質の progesterone (I) よりも著しく極性の大きい性状を示し、その ^1H NMR スペクトルより、基質および前述の代謝物 A, B とはその構造が著しく異なる化合物であることが推定された。すなわち、IR スペクトルにおいて 3340 cm^{-1} に水酸基にもとづく吸収を示し、UV スペクトルは 281 nm に極大吸収をもち、この吸収は希可性アルカリの添加により長波長シフトすることから、本化合物はフェノール性水酸基を有することが明らかとなった。また ^1H NMR スペクトルにおいては δ 6.61 に doublet-doublet ($J=2, 7$ Hz), δ 6.65 に doublet ($J=2$ Hz), δ 6.98 に doublet ($J=7$ Hz) の ABC 型の 3 個の芳香核水素のシグナルがみられる。また δ 1.16, および δ 2.25 にそれぞれ 3H singlet として

6) H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D.H. Williams, "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry," vol. 2, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964, p. 87.

7) a) F. Sondheimer, M. Velasco, G. Rosenkranz, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5673 (1955); b) B.E. McCarry, R.L. Markezich, W.S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4416 (1973).

8) H.H. Inhoffen, G. Zühlendorf, Huang-Minlon, *Ber.*, **73**, 451 (1940); J. Fried, R.W. Thoma, A. Klingenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5764 (1953).

2 個のメチル基にもとづくシグナルがみられる。このうち低磁場側のシグナルはトルエンメチル基に相当するものと考えられる。一方、IR スペクトルにおいては、 1730 cm^{-1} および 1700 cm^{-1} に強い吸収を有し、それぞれ 5 員環ケトン、および 6 員環ケトンの存在を示している。またこの化合物の ^{13}C NMR スペクトルは、19 個の炭素原子の存在を示し、そのうち水素と結合していない炭素 6 個、1 個の水素と結合している炭素 5 個、メチレン炭素 6 個、メチル炭素 2 個である。4 級炭素 6 個のうち最も低磁場側の 2 つのシグナル (δ 210.7, 218.0) はカルボニル炭素にもとづくものと考えられ、また δ 127.8, 141.9, 154.0 の 3 つのシグナルは置換基をもった芳香核炭素、残る 1 個は δ 47.6 にみられ、これはその chemical shift の値から推して、メチル基を有する核間炭素と考えられる。さらに 1 個の水素と結合している炭素 5 個のうち、低磁場側の 3 個 (δ 112.9, 115.8, 131.2) は芳香核炭素に帰属することができる。また本化合物の MS スペクトルは、 m/e 300 に分子イオンピークを示すほか、 m/e 134, および 121 に強いフラグメントピークがみられる。⁹⁾ 以上のデータより本代謝物は先に Dodson ら¹⁰⁾ が *Pseudomonas*, および *Arthrobacter* 属菌による androst-4-ene-3,17-dione (III) の代謝物としてえた 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione (VIII) と同一物質であると推定される。¹¹⁾

つぎに代謝物 D は、mp 227—230° の無色骰子状結晶としてえられ、その ^1H NMR スペクトルは実験の部に詳述するように、さきに述べた主代謝物 A (IV) のそれに類似しているが、 δ 3.24 に 1H triplet ($J=8\text{ Hz}$) のシグナルが認められること、IR スペクトルで 3450 cm^{-1} に水酸基にもとづく吸収のあること、および MS スペクトルで m/e 328 に分子イオンピーク、 m/e 310 に $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ のフラグメントイオンがみられる点が異なっている。これらのデータより本化合物は 1-dehydroprogesterone (IV) のいずれかの位置に 2 級水酸基をもつ構造を有するものと考えられるが、単離しえた量が微量のため構造を確定するまでにはいたらなかった。

つぎに代謝物 E は、mp 233—236° を示す無色針状結晶であり、その ^1H NMR スペクトルは δ 0.98, δ 1.28 に C_{18} , および C_{19} メチル基、 δ 2.16 に C_{17} アセチル・メチル基にもとづくシグナルを示している。またビニルプロトン領域においては、IV, V の ^1H NMR スペクトルにおけると同様 ABX 型の 3 個のプロトンのシグナル (δ 6.06 (br. s.), 6.20 (d. d., $J=2, 10\text{ Hz}$), 7.03 (d., $J=10\text{ Hz}$)) がみられ、また IR スペクトルにおける $1650, 1610, 1595\text{ cm}^{-1}$ の吸収、および UV スペクトルの 247 nm の極大吸収と考えあわせ、本化合物には $\Delta^{1,4}$ -3-keto 構造が存在することは明らかである。さらに ^1H NMR スペクトルにおいて δ 4.30 に 1H quartet ($J=4\text{ Hz}$) のシグナルがみられ、IR スペクトルにおける 3440 cm^{-1} の吸収と考えあわせ 2 級水酸基の存在が推定される。そこで本化合物を pyridinium chlorochromate (PCC)¹²⁾ を用いて酸化を行なったところ、IR スペクトルで水酸基にもとづく吸収が消失するとともに、新たに 1735 cm^{-1} に 5 員環ケトンの吸収がみられた。また ^1H NMR スペクトルにおいては、新たに δ 2.92 (1H, s.), 2.70 (1H, d., $J=10\text{ Hz}$), 3.05 (1H, br. d., $J=10\text{ Hz}$) の ABC 型のシグナルがみられることより、この酸化生成物は pregna-1,4-diene-3,15,20-trione (VII) と考えられ、¹³⁾ したがって、今回得た代謝物 E は 15-hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione(1-dehydro-15-hydroxyprogesterone) (VI) であると考えられる。なお水酸基の配位については、 ^1H NMR スペクトルにおいて、本化合物の C_{18} -メチル基の chemical shift (δ 0.98) が progesterone (I) のそれ (δ 0.69) よりも 0.29 ppm 低磁場にシフトしていることより、水酸基は β 配位 (15 s) をとっているものと推定される。

つぎに微量代謝物 F は、mp 186—188° を示し、 ^1H NMR スペクトルにおいて progesterone (I) と同様 δ 0.68, 1.28 に 2 個のメチル基、 δ 2.15 にアセチル・メチル基、 δ 5.84 に C_4 位のビニル・プロトンのシグナル

9) m/e 134 はカルボニル基の β 位で開裂したのち、 $\cdot\text{H}$ が脱離したフラグメント、 m/e 121 はベンジル位で開裂したフラグメントと考えられる。

10) R.M. Dodson, R.D. Muir, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4627, 4631 (1961).

11) Dodson より VIII, IX の標品を入手しえなかったので直接比較することができなかった。なお文献¹⁰⁾ では VIII は mp 123.5—125°, または 133.5—134.5° の polymorphism, IX は mp 68—72° または 133—134° の結晶として報告されているが、今回えた代謝物 C, G はともに単離しえた量が少く結晶化するまでにはいたらなかった。

12) E.J. Corey, J.W. Suggs, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 2647.

13) C_{17} -H が δ 2.92 にシグレットとしてみられることより、最初 16-keto の可能性も考えられたが、市販の 16,17 β -epoxyprogesterone より導いた ((1) DDQ, 2) CrCl_2 , 3) PCC) 化合物は予想されるように、 ^1H NMR においてケト体、エノール体の 1:1 の混合物となることが認められた。

を示すほか、 δ 4.00 に 1H triplet ($J=8$ Hz) として新たなシグナルが認められる。さらに IR スペクトルにおいて 3400 cm^{-1} に水酸基にもとづく吸収が観察される。また MS スペクトルは m/e 330 に分子イオンピークを示すほか、 m/e 312 ($M-H_2O$)、 m/e 124 に強いフラグメントピークが認められる。これらの data より本化合物は基質 progesterone (I) のいずれかの位置に水酸基が導入されたものと推定されるが、単離しえた量が微量のため、その位置を確定するまでにはいたらなかった。

つぎに代謝物 G は、無色油状物として極く微量えられ、前述の代謝物 C, 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione (VIII) と各種スペクトルが酷似しているが、 ^1H NMR スペクトルにおいては、 δ 3.75 に新たに 1H triplet ($J=7$ Hz) がみられ、また 2 個のメチル基のシグナルのうち 1 個が δ 1.07 にあらわれており、VIII のそれより 0.09 ppm 高磁場にシフトしている。また IR スペクトルでは VIII において 1730 cm^{-1} にみられた 5 員環ケトンの吸収が消失している。MS スペクトルは分子イオンピークが VIII よりも 2 mass unit 多い m/e 302 にみられるほかは、強いフラグメントピーク (m/e 134, 121) は変化していない。以上のデータより本化合物は、Dodson ら¹⁰⁾ がさきの 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione (VIII) と同時に単離証明している 3,17-dihydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9-one (IX)^{10,11,14)} と同一物質ではないかと予想されるが、微量のため構造を確定しえなかった。

なお Shull ら⁹⁾ が、今回用いたのと同属菌株の主代謝物として報告している 11 β -hydroxyprogesterone の存在は確認しえなかった。

以上のように今回用いた供試菌株 *Curvularia lunata* IFO (5997) 株は progesterone (I) に対し、従来報告されているものとは異なり、A 環に対する脱水素反応が主代謝経路であり、同時に 17 位水酸化により酸化的にアセチル基を脱離した V, 9 位水酸化後 *retro*-Aldol 縮合により生じたと考えられる VIII, IX, および 15 位に水酸化を受けた代謝物 VI を単離証明したことは興味あることである。

実 験 の 部

mp は未補正。微量融点測定器 (柳本製作所) を使用。 ^1H NMR は日本電子 PS-100 型 n. m. r. spectrometer を用いて測定、溶媒: CDCl_3 。Chemical shift は tetramethylsilane (TMS) を内部標準とした δ (ppm) 値。 ^{13}C -NMR は日本電子 JNM-PFT 60 にて測定、溶媒: CDCl_3 。Chemical shift は TMS を内部標準とした δ (ppm) 値。MS は日立 GC-MS M-52 を用い direct inlet system で測定。IR は日本分光 IRA-1 赤外線分光光度計、UV は日本分光 UVIDEC-1 紫外線分光光度計、旋光度は日本分光 DIP-SL 自動旋光計を用いそれぞれ測定した。

供試菌株 本実験に使用した微生物 *Curvularia lunata* IFO (5997) は、1977 年 4 月財団法人醸酵研究所から分与を受けたものである。

種培養 米コウジ 250 g を布袋に入れ、蒸留水 1 l 中に浸し、55—60° に加温、5 時間。ここにえたコウジ汁を 3 l 容ファーメンターに入れ、120°, 20 min オートクレーブで滅菌 (滅菌後の pH 約 5.0)。これに供試菌株を馬鈴薯斜面寒天¹⁵⁾ 上 7—10 日間培養させた孢子あるいは菌糸を接種し、20° で 8 日間通気培養 (通気速度約 3 泡/秒)。

休止菌体法 (Resting Cell Method) による Progesterone (I) の変換 前述の方法で 8 日間菌を増殖させたのち、培養液を滷去。得られた菌体を 1 l の蒸留水で洗浄、再度滷過して圧搾 (30 g)。これを NaNO_3 0.2 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, 蒸留水 2 l を入れた 3 l 容三角フラスコ中に懸濁 (pH 約 6.0)。ついで基質の progesterone (I) 1 g を 20 ml EtOH に溶かしたものを加え、20°, 5 日間通気攪拌培養。

代謝物の分離 上記の方法により培養後の菌液を 3000 rpm, 30 min 間遠心分離し、菌体と上澄液とに分け、菌体はアセトンで 2 回、クロロホルムで数回洗浄。また上澄液はクロロホルムで数回抽出。菌体洗浄液とクロロホルム抽出液を合わせ、無水 Na_2SO_4 で乾燥、減圧下溶媒留去。残渣をシリカゲル¹⁶⁾ カラムクロマトにかけ、ベンゼン、 CHCl_3 , AcOEt, MeOH により順次展開。さらに各々のフラクションについて prep. 薄層クロマトグラフィー (TLC)¹⁷⁾ を行ない、下記の R_f 値¹⁸⁾ を示す部分をそれぞれ集め、 CHCl_3 で浸出。溶媒留去。

14) Dodson らは 17 位の水酸基の配位は $s(\beta)$ としている。¹⁰⁾

15) 馬鈴薯の皮をむきスライスしたものを 20% (w/v) になるように水を加え、1 時間加温したのち、ガーゼで固形物を滷過。滷液に寒天 1.5%, sucrose 2% を添加して調整。

16) Wakogel C-200 (和光純薬)。

17) Kiesel gel 60 PF₂₅₄ (Merck)。展開溶媒、 CHCl_3 : アセトン : EtOH (8:1:1)。

18) Kiesel gel 60 F₂₅₄ (Merck)。展開溶媒: CHCl_3 , アセトン, EtOH (8:1:0.5)。

TLC¹⁸⁾ において単一スポットを示すようになるまで上記操作をくり返し、7種の化合物を単離した。Rf値の大きいものより順次代謝物 A, B, ..., G と仮称する。

Progesterone (I) Rf 0.90 (回収基質) 600 mg, 代謝物 A: Rf 0.83 (1-dehydroprogesterone (IV)) 200 mg; B: Rf 0.78 (androsta-1,4-diene-3,17-dione (V)) 50 mg; C: Rf 0.61 (3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione (VIII)) 10 mg; D: Rf 0.47 (1-dehydrohydroxyprogesterone) 4 mg; E: Rf 0.44 (1-dehydro-15 β -hydroxyprogesterone (VI)) 3 mg; F: Rf 0.43 (hydroxyprogesterone) 2 mg; G: Rf 0.32 (3,17 β -dihydroxy-9,10-*seco*-1,3,5 (10)-androstatriene-9-one (IX)) 7 mg.

代謝物 A (Pregna-1,4-diene-3,20-dione(1-Dehydroprogesterone) (IV)⁷⁾ アセトン・*n*-ヘキサンより再結晶。無色針状結晶。mp 152—154°. $[\alpha]_D^{25} + 119^\circ$ ($c = 0.18$, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 244. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1693 (C₂₀=O), 1655, 1616, 1600 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O). MS *m/e* 312 (M⁺), 227, 122. ¹H NMR δ : 0.70 (3H, s., 18-CH₃), 1.23 (3H, s., 19-CH₃), 2.09 (3H, s., 21-CH₃), 6.00 (1H, br.s., C₄-H), 6.14 (1H, d.d., $J = 2, 10$ Hz, C₂-H), 6.95 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁-H). 別途合成した pregna-1,4-diene-3,20-dione(1-dehydroprogesterone) (IV) (lit. 7, mp 152—153°, $[\alpha]_D + 120^\circ$ (CHCl₃)) と IR (CHCl₃), ¹H NMR, MS により同定した。

Progesterone (I) より Pregna-1,4-diene-3,20-dione(1-Dehydroprogesterone) (IV)⁷⁾ の合成 Progesterone (I) 50 mg をベンゼン 5 ml に溶解し、2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) 80 mg を加え 18 hr 還流。反応終了後ベンゼンで希釈し、水洗。ベンゼン層は無水 Na₂SO₄ で乾燥、溶媒留去。残渣をシリカゲルクロマトにかけベンゼン、続いて CHCl₃ で展開し精製。アセトン・*n*-ヘキサン溶液より結晶析出。無色針状結晶。28 mg. mp 150—151°. $[\alpha]_D + 117^\circ$ ($c = 0.22$, CHCl₃). (lit. 7, mp 152—153°, $[\alpha]_D + 120^\circ$ (CHCl₃)).

代謝物 B (Androsta-1,4-diene-3,17-dione (V)⁸⁾ MeOH より無色針状結晶。mp 138—140°. $[\alpha]_D^{25} + 113^\circ$ ($c = 0.09$, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 244. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1725 (C₁₇=O), 1655, 1615, 1600 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O). MS *m/e* 284 (M⁺), 122. ¹H NMR δ : 0.96 (3H, s., 18-CH₃), 1.27 (3H, s., 19-CH₃), 6.07 (1H, br.s., C₄-H), 6.22 (1H, d.d., $J = 2, 10$ Hz, C₂-H), 7.02 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁-H). 下記のように別途合成した V の標品と IR (CHCl₃), ¹H NMR, MS の比較により同定した。

Testosterone (II) から Androsta-1,4-diene-3,17-dione (V) の合成 Testosterone (II) 100 mg をベンゼン 10 ml に溶解。DDQ 160 mg を加え、24 hr 還流。反応液を濃縮後シリカゲルクロマトに付し、ベンゼン・クロロホルムで展開、分別。1-Dehydrotestosterone 50 mg を得た。ついでこれをピリジン 10 ml に溶解。CrO₃ 50 mg とピリジン 2 ml より製した複合体に加え、室温で 18 hr 攪拌。水で希釈後 CHCl₃ で抽出。CHCl₃ 層は希塩酸、水で順次洗浄。無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去。シリカゲル prep. TLC (展開溶媒 CHCl₃-AcOEt (50:30)) により分離、精製。MeOH より無色針状結晶として androsta-1,4-diene-3,17-dione (V),⁸⁾ mp 139—141°, $[\alpha]_D^{25} + 117^\circ$ ($c = 0.11$, CHCl₃) (lit. 8, mp 139—140°, $[\alpha]_D + 115.8^\circ$ (CHCl₃)) 30 mg を得た。

代謝物 C 淡黄色油状。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 281 (0.1N KOH 添加により 300 nm まで長波長シフト)。IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3340 (OH), 1730 (C₁₇=O), 1700 (C₉=O)。MS *m/e* 300 (M⁺), 134, 121. ¹H NMR δ : 1.16 (3H, s., 18-CH₃), 2.25 (3H, s., 19-CH₃), 5.48 (1H, br. s., OH), 6.61 (1H, d.d., $J = 2, 7$ Hz, C₂-H), 6.65 (1H, d., $J = 2$ Hz, C₄-H), 6.98 (1H, d., $J = 7$ Hz, C₁-H). ¹³C NMR δ : 13.6, 18.3 (q., C₁₈, C₁₉), 22.6, 26.9, 36.2, 37.4, 49.4, 49.8 (t., C_{6,7,11,12,15,16}), 30.5, 31.1 (d., C_{8,14}), 47.6 (s., C₁₃), 112.9, 115.8, 131.2 (d., arom. -C), 127.8, 141.9, 154.0 (s., arom. -C), 210.7 (s., C₉), 218.0 (s., C₁₇)。本化合物は 3-hydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione (VIII)¹⁰⁾ と推定されるが確認しえなかった。¹¹⁾

代謝物 D エーテルより無色骰子状結晶。mp 227—230°. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 247. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3450 (OH), 1690 (C₂₀=O), 1650, 1610, 1595 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O)。¹H NMR δ : 0.82 (3H, s., 18-CH₃), 1.26 (3H, s., 19-CH₃), 2.14 (3H, s., 21-CH₃), 3.24 (1H, t., $J = 8$ Hz), 6.10 (1H, br. s., C₄-H), 6.25 (1H, d.d., $J = 2, 10$ Hz, C₂-H), 7.07 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁-H)。MS *m/e* 328 (M⁺), 310 (M-H₂O), 121。本化合物は hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione と推定されるが、水酸基の位置を決めるまでにはいたらなかった。

代謝物 E (15 β -Hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione (VI)) エーテルより無色針状結晶。mp 233—236°. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 247. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3440 (OH), 1690 (C₂₀=O), 1650, 1610, 1595 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O)。MS *m/e* 328 (M⁺), 310, 122. ¹H NMR δ : 0.98 (3H, s., 18-CH₃), 1.28 (3H, s., 19-CH₃), 2.16 (3H, s., 21-CH₃), 4.30 (1H, q., $J = 4$ Hz, C₁₅-H), 6.06 (1H, br.s., C₄-H), 6.20 (1H, d.d., $J = 2, 10$ Hz, C₂-H), 7.03 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁-H)。

代謝物 E の PCC による酸化 (Pregnan-1,4-diene-3,15,20-trione (VII) の生成) VI 12 mg を CH₂Cl₂ 2.5 ml に溶かし、氷冷下攪拌しながら PCC 12 mg を加え 5 hr 反応。ついで CHCl₃ で希釈後、有機層を希塩酸で洗浄。さらに水洗後無水 Na₂SO₄ で乾燥、溶媒留去、シリカゲルクロマトにより精製。エーテルより無色針状結晶 10 mg を得た。mp 192—195° (sint. 180°)。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 245. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1735 (C₁₅=O), 1700 (C₂₀=O), 1660, 1620, 1600 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O)。MS *m/e* 326 (M⁺), 122. ¹H NMR δ : 0.76 (3H, s., 18-CH₃), 1.24 (3H, s., 19-CH₃), 2.23 (3H, s., 21-CH₃), 2.92 (1H, br. s., C₁₇-H), 2.70 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁₆-H), 3.05 (1H, br. d., $J = 10$ Hz, C₁₆-H), 6.14 (1H, br. s., C₄-H), 6.30 (1H, d.d., $J = 2, 10$ Hz, C₂-H), 7.09 (1H, d., $J = 10$ Hz, C₁-H)。

代謝物 F アセトン・エーテルより無色針状結晶。mp 186—188°. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 244. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3400 (OH), 1690 (C₂₀=O), 1655, 1610 ($\Delta^{1,4}$ C₃=O)。MS *m/e* 330 (M⁺), 312, 124. ¹H NMR δ : 0.68 (3H, s., 18-CH₃), 1.28 (3H, s., 19-CH₃), 2.15 (3H, s., 21-CH₃), 4.00 (1H, t., $J = 8$ Hz), 5.84 (1H, br.s., C₄-H)。本化合物は

hydroxy-4-pregnen-3,20-dione(hydroxyprogesterone) と推定されるが水酸基の位置については微量のため証明しえなかった。

代謝物 G 無色油状。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 283. IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3320 (OH), 1690 ($\text{C}_9=\text{O}$). MS m/e 302 (M^+), 134, 121. ^1H NMR δ : 1.07 (3H, s., 18- CH_3), 2.23 (3H, s., 19- CH_3), 3.75 (1H, t., $J=7$ Hz, $\text{C}_{17}\text{-H}$), 5.00 (1H, br.s., OH), 6.54 (1H, d.d., $J=2,7$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 6.60 (1H, d., $J=2$ Hz., $\text{C}_4\text{-H}$), 6.96 (1H, d., $J=7$ Hz, $\text{C}_1\text{-H}$). 本化合物は 3,17 β -dihydroxy-9,10-*seco*-1,3,5(10)-androstatriene-9-one (IX)¹⁰⁾ と推定されるが単離しえた量が少く構造を確証しえなかった.¹¹⁾

謝辞 終りに臨み供試菌株を分与いただいた財団法人醸酵研究所, および ^{13}C NMR スペクトルを測定いただいた静岡大学理学部 入川氏に深謝いたします。