

氏名（本籍） いけ がわ しげ お
池 川 繁 男

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬 第 164 号

学位授与年月日 昭和53年3月8日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 ステロイドの微生物変換機構に関する立体化学的研究

(主 査)

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 曳 野 宏

教授 野 副 重 男

論文内容要旨

近年ステロイドの微生物変換は実用上の意義はもとより、高等動物における生合成のモデルとしても生物化学の領域で重要な位置を占めるにいたっている。とりわけステロイドのA環にみられる脱水素反応、水素添加反応はヒトにおける estrogen や androgen などの生合成機構とも関連するため、これまでその機構を解明すべく多くの研究が行なわれてきた。すなわち testosterone, androstenedione などの内因性 C_{19} ステロイドの胎盤、卵巣による estrogen への芳香化においては 19-メチル基の脱離とともに 1β -, 2β -水素が cis 脱離する。一方、微生物によるこの種の Δ^1 脱水素反応では 1α -, 2β -水素が trans 脱離することが重水素あるいはトリチウム標識基質を用いて明らかにされている。また, testosterone に代表される Δ^4 -3-ketosteroid が肝, 前立腺によって 5α -および 5β -dihydro 体に変換される際, 5位へは補酵素からの水素が, 一方4位へは培地からの水素が付加することが証明されている。しかしながら微生物によるこの種還元機構に関する研究はきわめてとぼしい。すなわち腸内細菌による cholestanone の coprostanone への変換において5位の水素は補酵素に由来することが判明しているのみで, 4位水素付加の立体化学については何ら検討がなされていない。本研究はこのような観点から微生物による脱水素, 水素添加, さらに二重結合の異性化をとりあげ, それらの機構を isotope technique を駆使して立体化学の観点から検討したものである。

初めに臭素あるいはメチル基で標識した基質を用いてしか検討されていない 5β -3-ketosteroid の脱水素反応をとりあげた。

まず基質として必要な重水素標識化合物の合成を行なった。すなわち testosterone を出発原料とし5工程を経て Δ^2 体(1)および Δ^3 体(2)に導き, ついで過酸で処理してそれぞれ対応する β -epoxy 体(3, 4)を得た (Chart 1)。

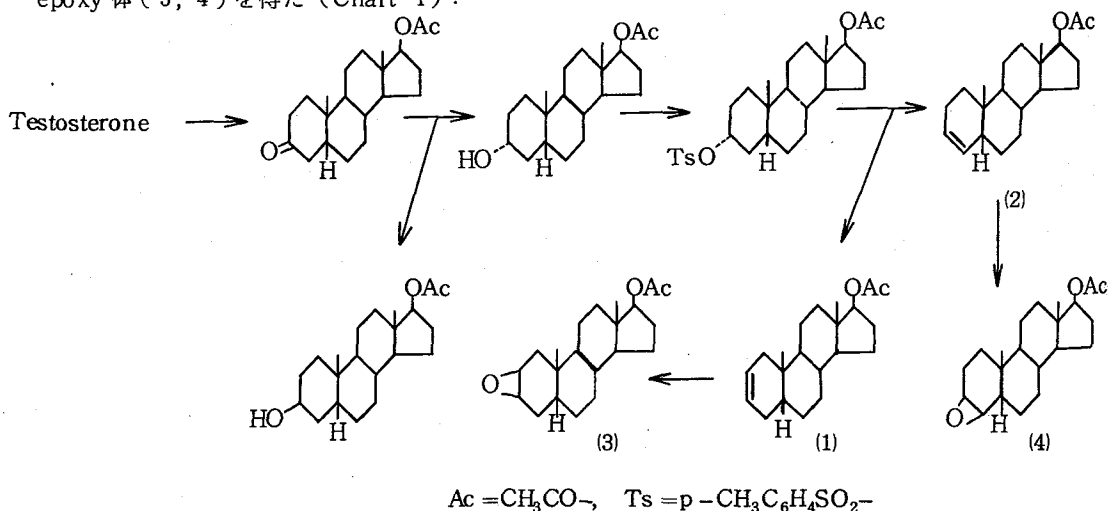


Chart 1

つぎに重水素を導入するため、(1)に deuteriodiborane (B_2D_6) を反応させ $2\beta-d_1-3\beta$ -hydroxy 体(7)を製した。一般に diborane は二重結合に対し cis 付加をすることが知られており 2 位の重水素は β 配位であることは明らかである。さらにこれをクロム酸-ピリジン試薬で酸化し $2\beta-d_1-5\beta$ -androstane-3, 17-dione (8)を得た。一方、(3)を lithium aluminum deuteride ($LiAlD_4$) で処理して epoxy 環の trans-diaxial 開裂を行ない先に同様に酸化して 2α -D 体(6)を製した。さらに 4β -および 4α -D 体 (12,10) もそれぞれ d^3 体(2)と $3\beta, 4\beta$ -epoxy 体(4)を用いて deuteration, $LiAlD_4$ 還元を行ない立体特異的に重水素を導入したのちクロム酸酸化して合成した (Chart 2)。ここに得られた重水素化合物はマスペクトル (MS) の解析からいずれも 98% 以上重水素を含むことを確認した。

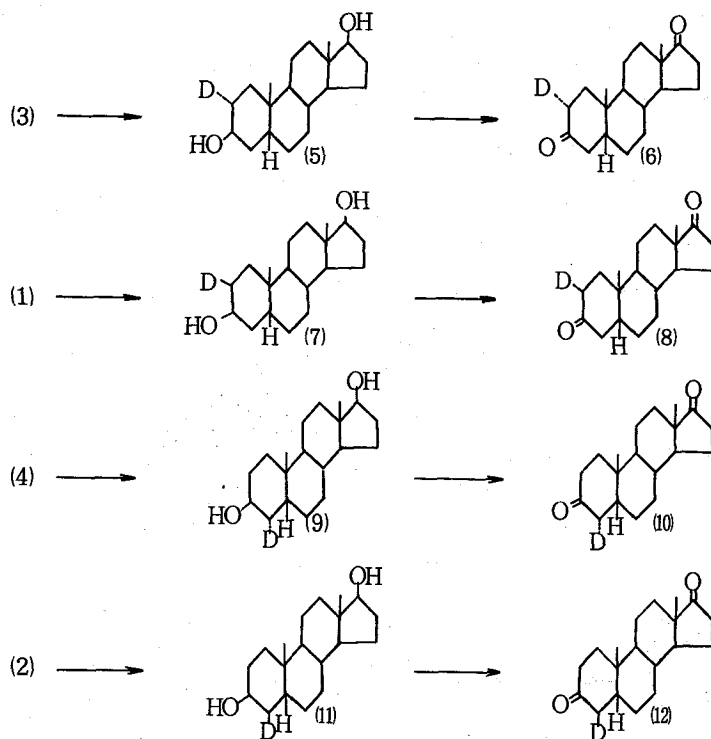


Chart 2

そこでこれらを基質として *Nocardia restrictus* の $105,000 \times g$ 上清による変換を行ない、androst-4-ene-3, 17-dione ならびに androsta-1, 4-diene-3, 17-dione (ADD) を単離した。これら変換成績体の MS を解析して重水素の保持率をもとめ Table I に示す結果を得た。

Table I Deuterium Retention of Products
in Microbial Dehydrogenation

Product	Substrate (%)			
	2 α -D(6)	2 β -D(8)	4 α -D(10)	4 β -D(12)
Androsta-1, 4-diene-3, 17-dione	89	0	2	78
Androst-4-ene-3, 17-dione	92	85	6	77

これらのデータからC-2では β 位水素が、他方C-4では α 位水素が立体選択的に脱離することが判明した。

微生物による3-ketosteroidの脱水素反応においては一般に基質のカルボニル基のエンオール化が考えられており、 α 位 axial 水素の脱離がみられる。しかしながら5 α -3-ketosteroidの Δ^4 不飽和化においては4位を臭素およびメチル基で標識した基質を用いて得た結果からaxialの4 α -水素が脱離すると結論されている。著者は重水素標識体がより適切な基質であると考え、4位を立体特異的に重水素標識した5 α -androsta-3, 17-dioneを合成し、これらを基質として4位水素脱離の立体化学に検討を加えた。

すなわち dehydroepiandrosterone より数工程を経て Δ^3 体(13)および3 α , 4 α -epoxy体(14)

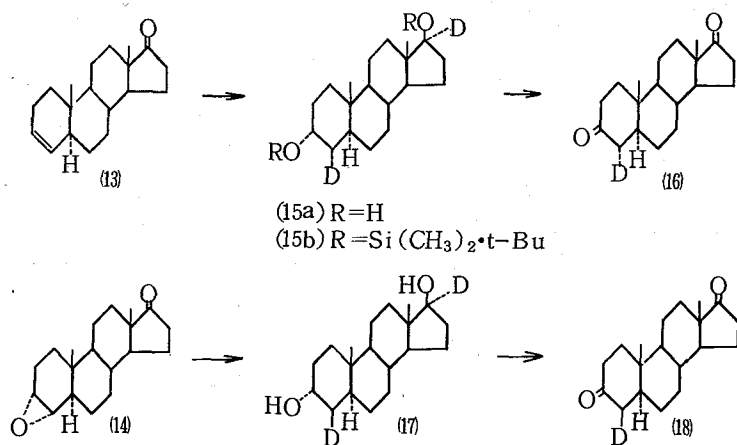


Chart 3

を製し、ついで(13)をB₂D₆によるdeuterationに付した。この際目的とする3 α -hydroxy体とともに3 β -hydroxy体、4 α -hydroxy体も副生し、それらとの分離が困難であった。そこで反応成績体をtert-butyl dimethylsilyl化し、さらにカラムクロマトグラフィーで精製して4 α , 17 α -d₂-5 α -androsta-3 α , 17 β -diol bis(tert-butyl dimethylsilyl) ether (15b)を単離した。ついで(15b)を脱シリル化して(15a)としたのちクロム酸で酸化し4 α -d₁-5 α -

androstane-3, 17-dione (16) を得た。第 2 の目的物である 4β -D 体 (18) は (14) を出発原料とし LiAlD_4 を用いる epoxide の還元的開裂反応により $4\alpha, 17\alpha\text{-d}_2\text{-}3\alpha, 17\beta\text{-diol}$ (17) としたのちクロム酸酸化して製した (Chart 3). (16) および (18) は MS の解析によりいずれも d_1 species が 95% 以上であることを確認した。

これらを基質として *Nocardia restrictus* の $3,000\times$ 上清による変換を行ない androst-4-ene-3, 17-dione および ADD を単離したのち、これら変換成績体の MS を解析し Table II に示す結果を得た。

Table II Deuterium Retention of Products in Microbial Dehydrogenation

Product	Substrate (%)	
	4α -D (16)	4β -D (18)
Androst-4-ene-3, 17-dione	98	0
Androsta-1, 4-diene-3, 17-dione	98	0

以上の事実から、 5α -3-ketosteroid が *Nocardia restrictus* により脱水素され Δ^4 -3-keto 体に変換される際、 4β -axial 水素が立体選択的に脱離することが明らかとなった。したがって先に Abul-Hajj が提出した 4α -equatorial 水素が脱離するという結論はここに訂正されねばならない。

Testosterone はヒトにおいてその二重結合が飽和され 5α -dihydrotestosterone に変換されたのち男性ホルモン作用を発現するが、微生物においてもこの種の還元反応が見い出されている。脱水素反応との関連からも興味もたれることから *Penicillium decumbens* による androst-4-ene-3, 17-dione の 5α -androstane-3, 17-dione への変換反応をとりあげ、4 位水素付

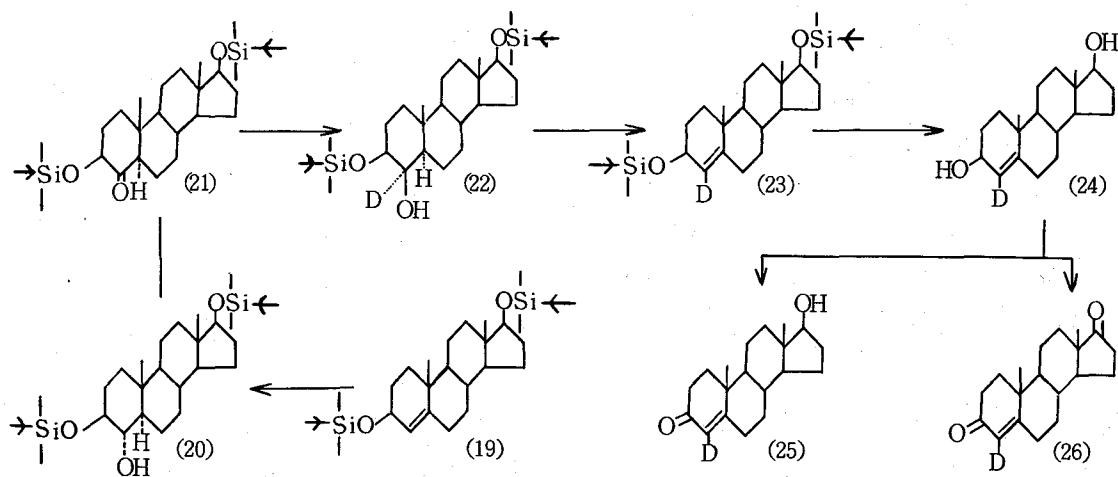


Chart 4

加の立体化学を検討した。すなわち基質として4位に重水素標識した androstenedione を合成し, *Penicillium decumbens* による変換を行ない, 生成する5 α -H体に保持される重水素の位置をNMRスペクトルにより決定することを試みた。

まずChart 4に示す経路に従い基質の合成を行なった。すなわち testosterone より2工程で得られる androst-4-ene-3 β , 17 β -diol bis (tert-butyl dimethylsilyl) ether (19)を出発原料とし, diborane を用いる hydration に付し4 α -hydroxy 体 (20) を製した。ついで (20) をクロム酸酸化して4-keto 体 (21) としたのちLiAlD₄ で還元し4 α 位に重水素が導入された4 β -hydroxy 体 (22) を得た。さらに (22) をオキシ塩化リンを用いる脱水反応に付し Δ^4 体 (23) としたのち (n-C₄H₉)₄NFにより保護基をはずし3 β , 17 β -diol (24) に導いた。最後に緩和な条件下クロム酸酸化して目的とする4-d₁-testosterone (25) および4-d₁-androstenedione (26) を得た。(25) および (26) はMS およびNMR スペクトルの解析の結果いずれも98%以上4位に重水素を含むことが判明した。

(26) を基質とし *Penicillium decumbens* による変換を行なったところ92%の高いd₁ species を有する5 α -androstane-3,17-dione が単離された。変換成績体を5 α -androstane-3 β , 17 β -diol 17-monosilyl ether に誘導し, Eu(dpm)₃ をシフト試薬に用いてNMR スペクトルを測定したところ重水素は4 α 位に保持されていることが判明した。

以上の結果 androstenedione が *Penicillium decumbens* により5 α -androstane-3,17-dione に変換される際, 4位の水素付加は立体選択的に β 側からおこるものと結論された。

ステロイドホルモンの工業的製造法として古くからステロールの微生物変換が試みられているが *Arthrobacter simplex* による cholesterol のADDへの変換におけるC-2, C-4からの水素脱離もこのような観点から興味深いものがある。そこで epimeric 2- および4-d₁-cholesterols を合成し, これを基質として *Arthrobacter simplex* による変換を行ないC-2, C-4水素脱離の立体選択性を検討した。

まず出発原料に cholesterol を用い数工程で中間体 (27), (28), (29) および (30) を製した。ついで (27) および (28) をそれぞれB₂D₆による deuteration, LiAlD₄還元 に付し3 α , 5 α -diol としたのちクロム酸酸化して5 α -hydroxy-3-ketone に誘導した。ついでメタノール中水素化ホウ素ナトリウムで還元し, 生成する3 β , 5 α -diol を3-monoacetate に導き塩化チオニルによる脱水, ついでアルカリ水解により2 α - および2 β -d₁-cholesterols を得た。一方 (29) および (30) をそれぞれB₂D₆, LiAlD₄ で処理し, ここに得られた3 α , 5 α - および3 β , 5 α -diol を前述同様の反応経路にしたがって目的とする4 α - および4 β -d₁-cholesterols に誘導した。

これらを基質として *Arthrobacter simplex* による変換を行ない生成したADDのMSを解析してTable IIIに示す結果を得た。これらのデータから cholesterol のADDへの微生物変換では2位, 4位ともに β 位水素が立体選択的に脱離することが明らかとなった。

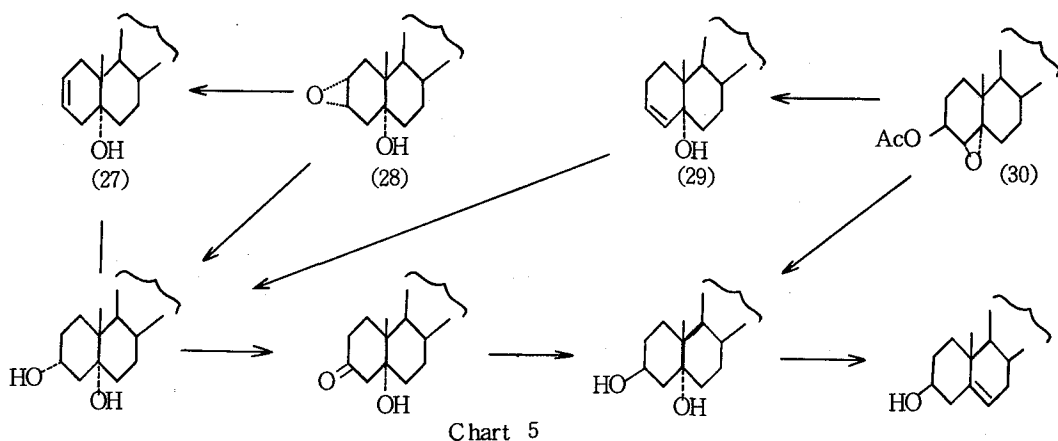


Table III Results of Deuterium Retention

Product	Substrate (%)			
	2 α -D	2 β -D	4 α -D	4 β -D
Androsta-1, 4-diene-3, 17-dione	75	0	80	0

Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid の Δ^4 -3-keto 体への変換はヒトにおけるステロイドホルモンの合成上重要な位置を占めている。この変換は $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ の異性化を伴うがその機構は従来比較的合成容易な Δ^5 -3-ketosteroid の 4 β 重水素あるいはトリチウム標識体を用いてしか検討されおらず不明の点が多量に残されている。そこで epimeric 4-および 6-d₁-cholesterols を基質に用い二重結合異性化の立体化学を明らかにすることを試みた。

すなわち 4-および 6-d₁-cholesterols を cholesterol oxidase [E. C. 1. 1. 3. 6] とインキュベートし、生成する cholestenone の MS を解析し Table IV に示す結果を得た。また保持された重水素の位置は NMR スペクトルならびに 6 位を立体特異的に重水素標識した cholestenone との IR スペクトルの比較により決定した。その結果 4 α -D 体、6-D 体を基質とした場合標識重水素はそれぞれ 4 位、6 α 位に、一方 4 β -D 体では 6 β 位に保持されることが判明した。

Table IV Results of Deuterium Retention

Product	Substrate (%)		
	4 α -D	4 β -D	6-D
Cholestenone	98	51	98

以上の事実から cholesterol の cholestenone への変換においては 4 β 位水素が 6 β 位に転移するものと結論された。

審査結果の要旨

本研究はステロイド化合物の微生物変換にみられる脱水素反応、水素添加反応の機構を重水素標識法により立体化学的観点から検討したものである。

まず 5β -3-ketosteroid の脱水素反応をとりあげ、基質として必要な 2α -および $4-d_1$ - 5β -androstane-3,17-dione の合成を行なった。すなわち Δ^2 , Δ^3 化合物を中間体とし、得られる β -epoxide を $LiAlD_4$ で還元的に開裂し、 2α -および 4α - d_1 - 3β -ol を得た。一方、 Δ^2 , Δ^3 体に deuteriodiborane を働かせ、 β -cis に付加した 2β -および 4β - d_1 - 3β -ol を製した。さらにそれぞれをクロム酸-ピリジン試薬で酸化し、目的とする重水素標識体 4 種を合成した。

これらを基質として *Nocardia restrictus* による変換を行ない、androst-4-ene-3,17-dione および androsta-1,4-diene-3,17-dione を単離した。これら成績体の重水素保持率を MS スペクトルで測定した結果、C-2 では β 水素が、他方 C-4 では α 水素が立体選択的に脱離することが判明した。

また、 5β -3-ketosteroid の Δ^4 不飽和化における C-4 の水素脱離を同様の手法を駆使して検討した。すなわち基質の 4α -ならびに 4β - d_1 - 5α -androstane-3,17-dione を *N. restrictus* による変換に付し、生成する Δ^4 体ならびに Δ^{14} 体の重水素保持率を測定した。その結果 4β 水素が立体選択的に脱離することが証明され、Abul-Hajj の報告を訂正する結論を得た。

さらに Δ^4 -3-ketosteroid の 5α -steroid への変換における C-4 水素添加の立体化学を吟味した。すなわち testosterone より数工程で製した 5α -4-keto 体の $LiAlD_4$ 還元により C-4 に重水素を導入したのち脱水、酸化に付し、目的とする基質の $4-d_1$ -androstenedione を得た。*Penicillium decumbens* により変換した生成物 5α -androstane-3,17-dione のシフト試薬を用いる NMR スペクトルの解析などから還元成績体は 4α に重水素が保持されていることが判明した。

最後に Δ^5 - 3β -hydroxysteroid の Δ^4 -3-keto 体への変換における 4 位水素の挙動を精査した。基質として合成した 4α -および $6-d_1$ -cholesterol を cholesterol oxidase とインキュベートし、生成する cholestenone の各種機器データからこの変換過程において 4β 水素が 6β 位に転移することを証明した。

以上のごとく本論文は重水素標識法を駆使し、ステロイドの微生物変換の機構を立体化学の観点から検討し、従来未開拓であったこの分野に数々の新知見を加えたものであり学位論文として十分価値あるものと認める。