

微生物에 의한 Cholesterol 과 그 誘導體의 分解機構 * II

19-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione 의 分離

李 相 變**

(Received Nov. 20, 1968)

Sang Sup Lee: Degradation Mechanism of Cholesterol and Its Derivatives by Microorganisms. II Isolation of 19-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione

When 19-hydroxycholesterol acetate was added into CSD-10 in Nutrient Broth or in a mineral salts medium consisting of KH_2PO_4 (0.1%), K_2HPO_4 (0.1%), NH_4NO_3 (0.1%), MgSO_4 (0.02%), CaCl_2 (0.002%), and FeCl_3 (0.005%), a substantial amount of 19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione was accumulated prior to accumulation of estrone. From this result and all of previous works, a tentative degradation pathway of 19-hydroxycholesterol acetate to estrone by CSD-10 was derived.

19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione seems to be an attractive intermediate for the synthesis of 19-norsteroids.

緒 論

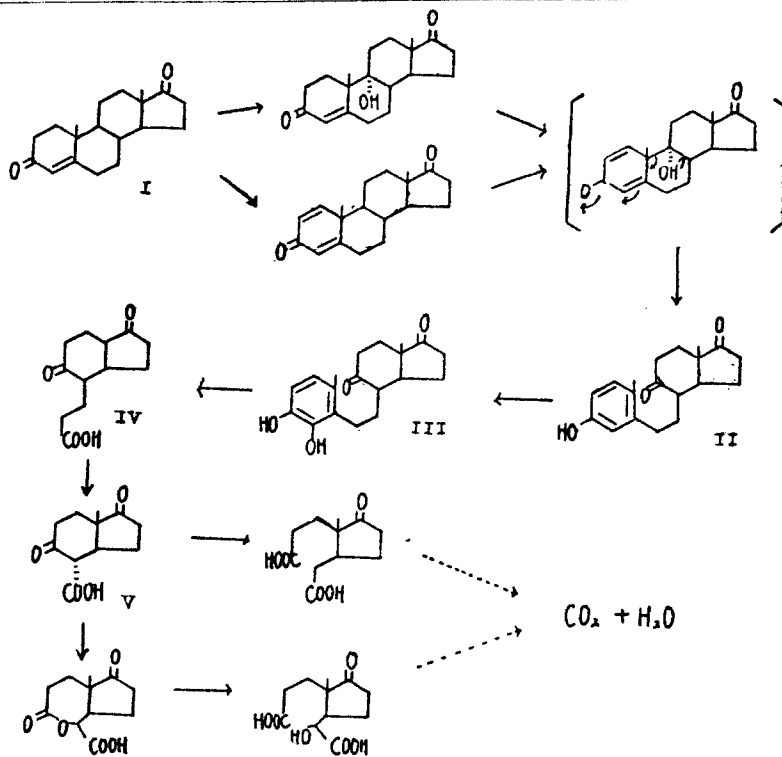
土壤菌이 cholesterol 를 唯一한 炭素源으로 하여 잘 增殖한다는 것은 50 餘年前 Sohngen 의 實驗¹⁾에 依하여 이미 알려져 있는바이나 sterol 또는 steroid 가 微生物 增殖의 炭素源으로서 利用될 때 그것의 分解機構를 系統的으로 研究하기에 이른 것은 近年의 일이라 하겠다. Dodson²⁾은 Androst-4-ene-3,17-dione (I) 의 微生物學的 分解產物로서 3-hydroxy-9,10-secoandrost-1,3,5(10)-triene-9,17dione (II) 을 얻었으며 Sih 等³⁾은 이 secophenol 이 9 α -hydroxylation 과 1,2-dehydrogenation 을 通하여 이루어지는 生成機構를 解명한바 있다. 今後 著者等은 secophenol (II) 이 3,4-catechol 中間體(III) 을 거쳐 indanepropionic acid 誘導體(IV)^{4,5,6)} 가 되고 다시 β -oxidation 되어 indanecarboxylic acid 誘導體(V) 를 經由하여 窮極의으로는 CO_2 와 H_2O 로 完全分解되는 機構에 對하여 報告하였다.⁷⁾ (例圖 1)

한편 C_{17} 側鎖를 가진 sterol 系 物質의 酸化機構에 關한 研究는 단편의이고 또 그 結果에 있어서 相反되는 것이 있는 것은^{8,9,10)} 研究者들이 使用한 菌株 및 實驗方法의 差異에서 온 것으로 思料된다.

著者는 本研究의 第 1 報等^{11,12)}에서 cholesterol 과 그 合成誘導體들의 分解產物들을 分離確

* 第 1 報 : 서울大學校 論文集, 醫藥系 第 18 輯, (C) 18-1967

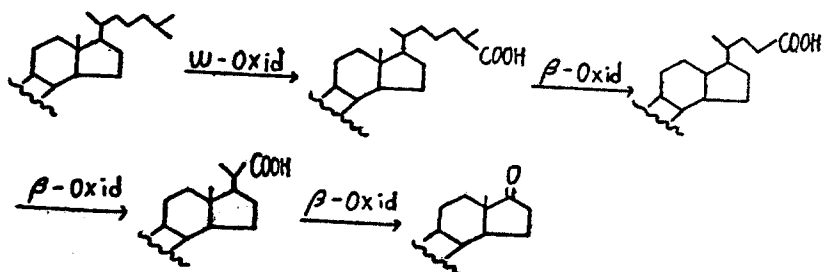
** College of pharmacy, Seoul National University



例圖 1.

認하고 가능한 側鎖의 分解機構로는 例圖 2와 같이 ω -oxidation 이 이러한 後 連續的인 β -oxidation 을 거쳐 17-ketosteroid 가 生成된다고 하였다. 또 sterol 의 側鎖酸化와 母核開環反應 사이에는 絶對的인 分解反應의 順序가 있는 것을 아니고 側鎖와 母核의 性質을 考慮하여 cholesterol 를 于先 그 誘導體로 만들어서 母核分裂反應을 抑制한後에 側鎖를 酸化시킴으로써 새로운 17-ketosteroid 의 合成經路를 發見하였던 것이다.¹³⁾

本報告에서는 第 1 報에서 取扱한 合成基質의 하나인 19-hydroxycholesterol acetate 를 合成하여 CSD-10 培養液에 添加하여 培養할때 培養條件을 바꿈으로써 estrone 以外에 estrone 生成 先驅體로 생각되는 19-hydroxyandrost-4-ene-3, 17-dione 을 Nutrient Broth 와 salt medium 에

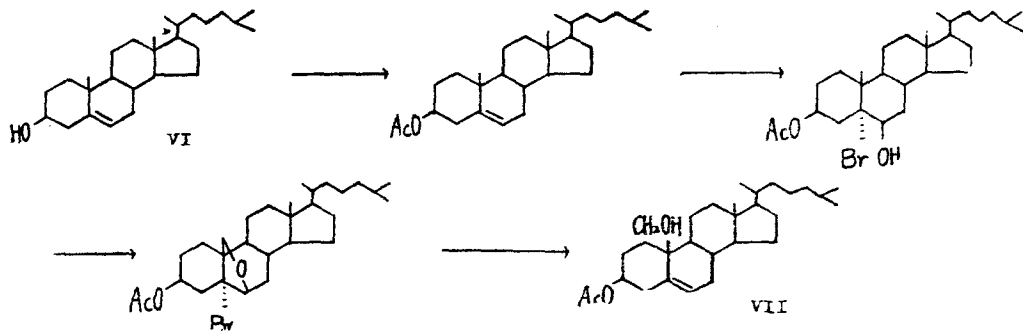


(例圖 2)

서 各各 分離 確認하였다. 이것은 母核分裂과 側鎖分裂의 相關關係를 究明하는데 一助가 되는 것으로 생각된다.

結 果

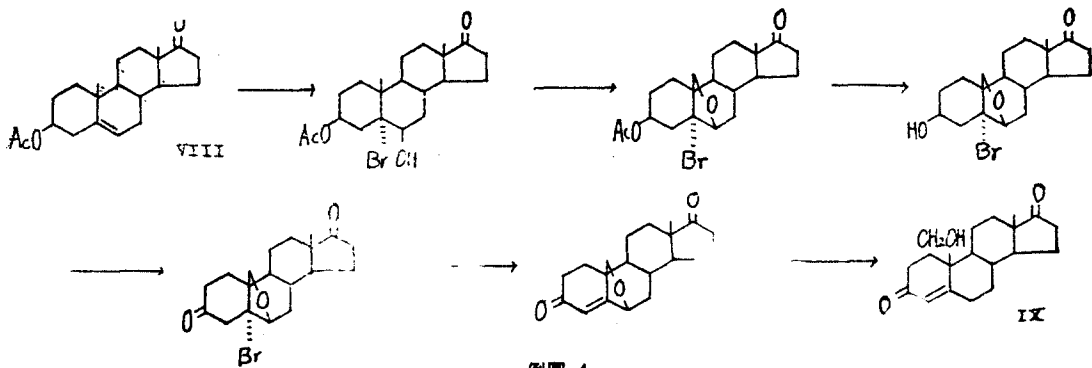
微生物反應의 基質로 使用한 19-hydroxycholesterol acetate(VI)는 屠獸場에서 收集한 新鮮한 韓牛의 腦髓를 homogenizer 로 분쇄한 後 acetone 抽出에 依해서 얻어지는 粗 cholesterol (VI)를 다시 ethanol로 再結晶하고 acetylation 한後 Kalvoda¹⁴⁾의 方法에 準하여 3段階反應으로 比較的 良好한 收得率로서 合成 할 수 있었다.(例圖 3)



例圖 3.

cholesterol를 炭素源으로 하고 salt medium 中에 保存한 CSD-10을 Nutrient Broth 에 옮겨 rotary shaker 上에서 培養할때 이 合成基質(VII)를 300 γ /ml 濃度로 添加하고 培養時間의 經過에 따르는 sterol의 消長을 paper chromatography 와 thin layer chromatography 로 追跡하였다. 培養時間 24 時間後부터 나타나기 始作한 Zimmerman 反應 陽性的 非 phenol性 17-ketosteroid의 斑點은 50 時間 前後까지 蓄積되다가 다시 時間이 經過함에 따라 漸次的으로 減少 되었으나 이것에 反하여 estrone은 繼續的인 增加를 보였다. 非 phenol性 17-ketosteroid의 斑點은 強한 紫外線吸收性을 가지며 그 Rf 值로 推測할때 炭素 \times 位置에 水酸基가 1 個 들어 있는 C₂-hydroxyandrostenedione系 物質이거나 또는 C-1,2-dehydrogenase의 activity가 貧弱하여 steroid A 環이 芳香化하기 以前에 C₁₇ 側鎖가 完全脫落되어 버린 19-hydroxyandrostenedione 일 것으로 推定된다. 그러나 培養初期에는 蓄積되다가 後期에 이르러서는 오히려 減少되는 傾向으로 미루어 後者일 可能性이 크다.

本試驗으로 19-hydroxycholesterol acetate(VII)를 Nutrient Broth 中에 添加하고 50 時間 培養한 培養液을 chloroform 으로 抽出하고 alkali 處理로 phenol性인 estrone 區分을 먼저 分離한 後 中性物質區分을 조그만 silica gel column 에 충전하고 chloroform : methanol(99.5 : 0.5)로 展開溶出시켜 目的하는 17-ketosteroid 區分만을 分離하였다. acetone, pet.ether 로 再結晶한 것은 m.p 167~169°(文獻上 170~171°) $\lambda_{max}=244m\mu$ (EtOH) 이었다. 이 物質少量을 pyridine, 無水醋酸 同容量混液에 녹여 室溫에서 1夜 放置하면 쉽게 acetylation 이 됨으로 存在하는 水酸基의 位置는 19-OH 일 것이 分明하다.



最終的인 確認을 위하여 dehydroisoandrosterone(VIII)를 出發物質로하여 例圖 4 와 같이 6 階反應으로 19-hydroxyandrostenedione(IX)을 合成하였다.^{15,14)} 이 合成物質과 培養液에서 分離한 物質은 混融試驗을 비롯하여 모든 性質이 同一하였다.

繁殖은 느리나 無機鹽類培地에 直接 19-hydroxycholesterol acetate 를 添加하여 주어도 同一한 結果를 얻으리라는 豫測下에 cholesterol 含有無機鹽培養液에 培養한 CSD-10 을 다시 無機鹽培養液에 옮기고 cholesterol 代身에 19-hydroxycholesterol acetate 를 300 γ /ml 濃度로 添加하여 rotary shaker 上에서 14 日間 繼續培養하면서 sterol 의 消長을 檢討하였다. (例圖 5) Nutrient Broth 에 比較 增殖은 느리고 또 基質이 消失되는 速度도 느렸으나 基質은 完全히 消失되어 19-hydroxyandrostenedione 과 estrone 으로 轉換되었다.

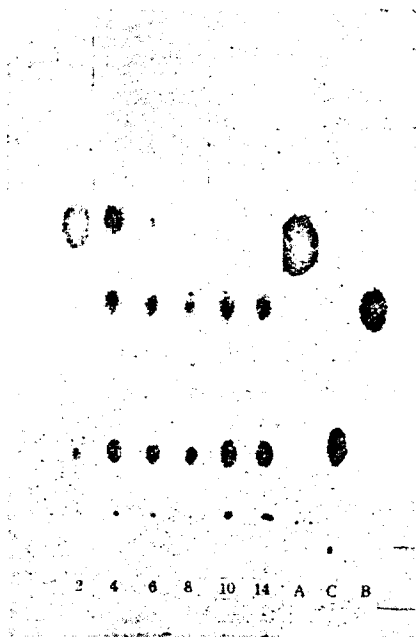
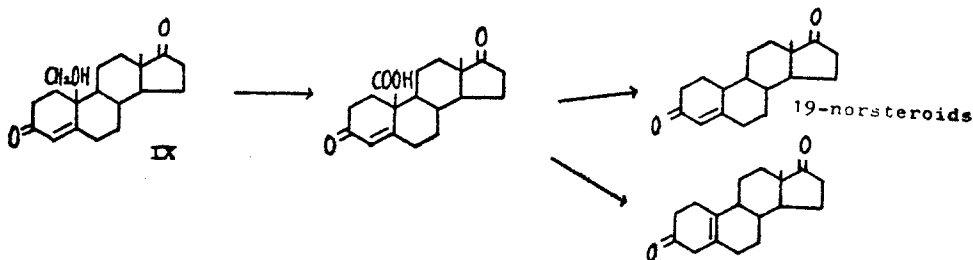


Fig. 5. Degradation pattern of 19-hydroxycholesterol acetate(VI) to 19-hydroxyandrostenedione(IX) and estrone by CSD-10.

15 mg of Compound VII was added to 50 ml of salts medium in a 300 ml Erlenmeyer flask and simultaneously 3 ml of 4-day grown CSD-10 salts medium culture enriched with cholesterol was also added. Fermentation was kept on a rotary shaker (120rpm, 1"stroke, r.t.). Samples were removed for analysis after 2, 4, 6, 8, 10 and 14 days. Each aliquot of the chloroform extract of the culture broth was spotted on a silica gel thin layer plate and developed with chloroform:acetone (80:20). The degradation products were detected by heating after spraying sulfuric acid. A: Compound VII B: estrone C: Compound IX. Numbers denote fermentation period (day)

考 察

19-hydroxycholesterol acetate(VII)를 CSD-10 와 Nutrient Broth culture 에 添加하여 19-hydroxyandrostenedione(IX)을 새로이 分離하였다. 小規模의 培養試驗이었으므로 定量的인 數值를 얻을 수는 없었으나 培養條件 調整如何에 따라서는 estrone 以外에 相當한 量의 19-hydroxyandrostenedione(例圖 5)을 얻을 수 있다는 確信을 갖게 되었다. 이 物質은 例圖 6 과 같은 2 段階反應으로 쉽게 19-norsteroid 가 될 수 있으며^{16,14)}

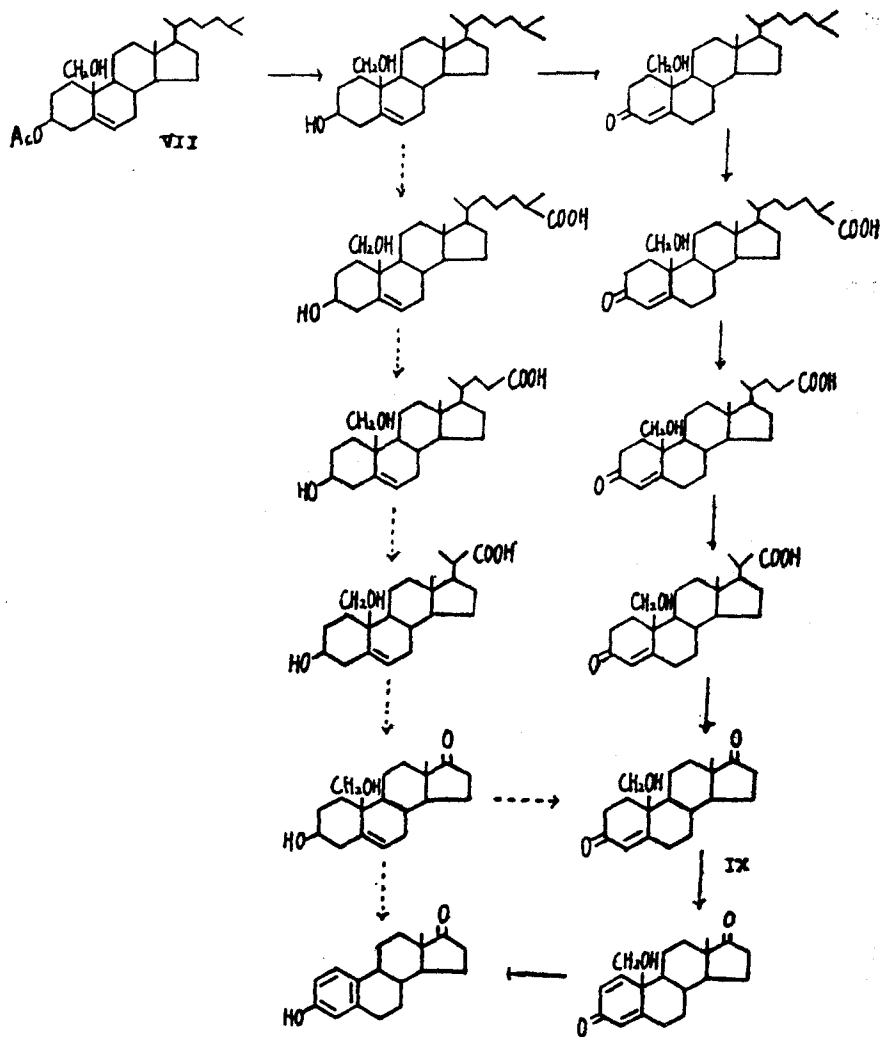


例圖 6.

C-17 에 ethynyl 基나 alkyl 基를 導入한 19-norsteroid 誘導體는 強力한 progestin 이며 排卵 抑制作用¹⁷⁾을 갖거나 蛋白 同化촉진作用¹⁸⁾을 갖는 것이 많음으로 steroid 激素의 原料生産과 結付시켜 生覺할때 意義있는 發見이라 하겠다.

觀點을 바꾸어 微生物에 의한 sterol 代謝機構를 解明하는 見地에서 19-hydroxyandrostenedione 分離의 意義는 이 物質이 CSD-10 에 의한 代謝最終產物로서 얻어지는 estrone 生成 以前에 培養液中에 蓄積되는 唯一한 中間體라는 點이다. 第一報에서 19-hydroxycholesterol acetate 에서 72%란 高收得率로 estrone 을 分離한바 있었으나 如何한 代謝經路를 밟아 最終 產物로서 estrone 이 培養液中에 蓄積되었는지 推測할 수 없었다. 即 側鎖의 完全 離脫以前의 中間體에서 母核의 芳香化가 이루어지는지 또는 側鎖가 ω -oxidation 과 β -oxidation 을 거쳐 17-ketosteroid 까지 酸化된 然後 비로소 A 環의 芳香化가 일어나는지의 與否는 分明치 않으며 다만 側鎖(C₈H₁₇)는 保全되고 A 環만 芳香化한 3-hydroxycholest-1,3,5(10)-triene 을 전혀 酸化轉換을 받지 않는다는 것만 알려져 있다.¹⁹⁾

그러므로 19-hydroxyandrostenedione 의 分離는 17-ketosteroid 로 完全酸化된 然後에 A 環의 芳香化가 이루어진다는 것을 立證하는 것이며 可能한 分解機構는 例圖 7 와 같이 推定할 수가 있다. 그러나 著者는 CDS-10 培養液에 5 α -bromo-6 β ,19-oxidocholesterol acetate 를 添加하여 5 α -bromo-6 β ,19-oxidoisoandrosterone 를 分離하였으므로²⁰⁾ broken arrow 로 表示된 分解經路도 現時點에서는 完全히 無視할 수는 없다. CSD-10 以外면 *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonad* 등으로서도 estrone 은 生成되나 그 收得率이 不良함은 1,2-dehydrogenase 의 activity 가 強力하여 側鎖分裂이 完了되기 以前에 A 環의 芳香化가 進行하여 側鎖分裂이 停止되는 것으로 思料된다.



例圖 7. Degradation Pathway of 19-Hydroxycholesterol Acetate to Estrone by CSD-10

實驗之部

菌 株 : CSD-10⁴⁾은 아래 處方의 無機培養液中에서 貯藏 또는 繁殖시켰다.

無機培養液 :

MgSO₄ 0.2g, KH₂PO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, NH₄NO₃ 1.0g, CaCl₂ 0.02g, FeCl₃ 0.05g 에 蒸溜水를 加하여 1l로 만들어주고 여기에 cholesterol 0.3g을 4ml DMF에 녹인 것을 잘 攪拌하면서 滴下한다. 300ml Erlenmeyer flask 中에 50 ml 씩 分取하고 15 Lbs 壓 18分間 加壓

滅菌하였다.

Nutrient Broth: Difco Nutrient Broth(脫水物) 8g을 蒸溜 1l에 녹이고 300 ml Erlenmeyer flask 中에 50 ml씩 分取後 15 Lbs 壓 18 分間 加壓滅菌하였다.

Paper Chromatography:

Zaffaroni⁽²¹⁾의 方法에 準하여 下降法을 썼으며 濾紙는 Whatman No.1을 使用하였다.

Thin Layer Chromatography

stahl⁽²²⁾의 方法을 應用하였다.

Cholesterol:

屠獸場에서 收集한 韓牛腦髓 20kg(非乾燥重量)를 homogenizer로 短時間 갈아 homogenize한 後 同容量의 acetone을 2回 加하여 脫水시킨 다음 冷浸器中에 넣고 總量 100 l의 acetone으로 室溫에서 反覆抽出 하였다. acetone extract는 減壓濃縮하여 結晶膜이 生길 直前 放冷하여 粗 cholesterol 結晶을 分離하고 다시 96% ethanol에서 再結晶하여 精製 cholesterol 225g을 얻었다. (Thin layer chromatogram 上에서 單一 spot)

Cholesterol acetate

cholesterol 120g에 pyridine, acetic anhydride 各各 220ml씩 同一容量의 混液을 加하고 40~50°로 加溫溶解시킨後 一夜放置한다. 析出한 結晶을 母液에서 分離하고 母液은 室溫에서 通風 乾燥한다. 直接 結晶狀態로 얻어지는 量은 95g 이고 母液에서 얻어지는 量은 35g 이며 總收得量은 定量的이다.

3β-acetoxy-5α-bromo-6β-hydroxycholestane

20g의 cholesterol acetate를 200 ml dioxane에 녹이고 perchloric acid(60% perchloric acid 5.4ml를 19.2ml 물에 稀釋)를 加하고 다시 물 10ml를 加한다. 形成된 混濁液을 20°C 以下로 維持하면서 10g의 N-bromoacetamide를 少量씩 15分間에 걸쳐 攪拌하면서 添加한다.

添加가 끝나면 5°C로 冷却하여 다시 잘 攪拌하면서 1% Na₂S₂O₃ 120ml를 滴下한다. 反應混液은 過量의 물로 稀釋하여 形成된 沈澱은 有機溶媒로 抽出할 必要없이 直接 Buchner funnel에 收集하고 數回물로 씻어주고 室溫에서 通風乾燥後 thin layer chromatography로 主生成物이 bromohydrin인것을 確認한다. 精製하지 않고 直接 oxido化合物 合成原料로 使用하여 無妨하다. 收得量: 粗 bromohydrin으로서 約 20g.

3β-acetoxy-5α-bromo-6β-19-oxidocholestane

3l들이 round flask 中에서 lead tetraacetate 40g, CaCO₃ 12g를 加한後 1.5l의 cyclohexane을 注加하여 80°에서 加溫비등시킨後 I₂ 7.8g와 粗 3β-acetoxy-5α-bromo-6β-hydroxycholestane 6.5g를 加한다. 繼續 加熱하고 混液을 가끔 攪拌하면서 500 watt 白熱電燈을 照射하여 光化學的으로 遊離基反應이 잘 進行되도록 한다. 反應 70分後 冷却시킨다. 反應內容物을 celite를 通하여 濾過하고 濾液은 150ml의 10% Na₂S₂O₃液으로 反覆洗滌한後 물로 洗滌하고 Na₂SO₄ 上에서 乾燥後 減壓濃縮하면 Jelly 狀의 殘留物을 얻고 冷藏庫中에서 放冷時 結晶化한다. 精製를 하지 않고 直接 VII生成還元反應에 使用한다.

19-hydroxycholesterol acetate VII

粗 3β-acetoxy-5α-bromo-6β-19-oxidocholestane 全量(6.5g의 粗 bromohydrin으로부터 얻음)을 醋酸 160ml에 녹이고 물 7ml를 加한後 45~50°에서 攪拌하면서 새로이 活性化한 亞

鉛末 32g 를 15 分間에 걸쳐 加한다. 反應內容物을 室溫까지 冷却하고 濾過하여 過量의 亞鉛末를 除去하고 濾液을 減壓濃縮한다. 殘留物은 ether, methylene chloride(5:1) 混液에 녹인後 飽和 NaHCO_3 水溶液으로 洗滌하고, 다시 물로 中性이 될때까지 洗滌하고 Na_2SO_4 上에서 一夜放置後 溶媒를 減壓溜去한다. 同一溶媒混液으로 再結晶하면 m.p. 115~116°의 19-hydroxy-cholesterol acetate 3.0g 를 얻는다.

19-hydroxycholesterol acetate 의 CSD-10 培養試驗

前述한 salt medium 中에 CSD-10 stock culture 를 移植하고 cholesterol 를 炭素源으로하여 4 日間 rotary shaker 上에서 培養한다(1 inch stroke, 120 rpm, r.t.)

이 培養液 5ml 를 새 medium 에 옮겨 同一條件下에서 4 日間 繼代培養後 前述 Nutrient Broth 가 들어 있는 8 個의 300ml Erlenmeyer flask 에 옮기고 이것에 300 γ /ml 濃度로 19-hydroxycholesterol acetate 를 加한後 같은 條件下에서 50 時間 培養後 全體培養液을 合하여 醋酸酸性으로 한後 celite 層을 通過시켜 菌體를 濾過除去하고 濾液은 chloroform 으로 反覆抽出한다. 抽出液은 다시 물로 洗滌하고 Na_2SO_4 로 脫水한後 減壓濃縮한다. 濃縮殘渣를 ether 에 녹이고 5% NaOH 溶液으로 反覆抽出한다. alkali 溶液에 移行하지않는 中性物質이 녹아있는 ether 層은 다시 常法에 따라 處理하고 溶媒를 溜去하고 잔사를 다시 小量의 chloroform 에 녹인다. 이것을 조그만한 silicic acid column 에 충전하고 chloroform 으로 溶出하여 殘留基質을 除去하고 이어 0.5% methanol 性 chloroform 으로 계속溶出하여 19-hydroxyandrostenedione fraction 을 收集한다. acetone, pet. ether 로 一次再結晶하면 m.p. 163~167°의 無色結晶을 얻는다. 이 物質을 確認하기 위하여 dehydroisoandrosterone acetate 에서 出發하여 Kalvoda, 및 Grenville 方法^{14,15)}에 準하여 6 段階反應으로 19-hydroxyandrostenedione 을 合成하였으며 混融試驗, paper chromatogram, thin layer chromatogram, 最大吸收波長(紫外線)等을 比較 檢討한 結果 培養液에서 分離한 steroid 는 19-hydroxyandrostenedione 임이 分明하였다.

本 研究는 第 1 回 東亞自然科學獎勵會研究費 및 東亞製藥株式會社의 後援을 얻어 이루어졌습니다. 金泳根教授께서는 여러가지 助言을 아끼지 않으셨고 李鍾妍嬢은 어려운 實驗을 도와주었습니다. 삼가 感謝드립니다.

References

- 1) Sohngen, N.L., *Centr. Bakt.*, 2. Abt., 37, 595(1913).
- 2) Dodson, R.M., and Muir, R.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4627(1961).
- 3) Sih, C.J., and Wang, K.C., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2135(1963).
- 4) Sih, C.J., Lee, S.S. et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1385(1965).
- 5) Sih, C.J., Lee, S.S. et. al., *J. Biol. Chem.* 241, 540(1966).
- 6) Gibson D.T. et. al., *J. Biol. Chem.* 241, 551(1966).
- 7) Lee, S.S. and Sih, C.J., *Biochem.* 6, 1395(1967).
- 8) Horváth, J. and Krámlí, A., *Nature* 160, 639(1947).
- 9) Turfitt, G.E., *Biochem. J.* 42, 376(1948).
- 10) Santer, M, and Ajl, S. J., *J. Biol. Chem.*, 199, 85(1952).
- 11) Lee, S.S., *Seoul University Journal(C)* 18, 94(1967).
- 12) Sih, C.J., Lee, S.S. et. al., *Biochem.*, 7, 808(1968).
- 13) Sih, C.J., Lee, S.S, et, al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 2765(1965).

- 14) Kalvoda, J. et al., *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1361(1963).
- 15) Grenville, V, et al., *J. Chem. Soc.*, 4105(1957).
- 16) Hagiwara, H, et al., *Chem. pharm. Bull. Japan* **8**, 84(1960).
- 17) Pincus, G, and Merrill, A.P., in "Control of Ovulation. Villee, C.A. (ed.) Pergamon press, New York. N.Y. 1961, p. 37.
- 18) Applezweig, N., *Steroid Drugs. Vol. I. II.* (1964).
- 19) Sih, C.J. and Wang, K.C., *J. Am. Chem., Soc.*, **87**, 1387(1965).
- 20) Lee, S.S, in press.
- 21) Zaffaroni, A., et al, *Science* **111**, 6 (1950).
- 22) Stah, E., in *Thin Film Chromatography by Truter. E.V.*(1963).