

145. 微生物によるヌクレオシド生産の研究

(第1報) *Bacillus subtilis* のヌクレオシド生産性変異株による

天然核酸塩基からリボヌクレオシドへの変換

山野井昭雄・広瀬 義輝・青木 幹男・城 照雄

(味の素(株)中央研究所)

目 的

微生物の生菌体および無細胞抽出液を用いて天然および非天然核酸塩基をそれぞれに対応するリボヌクレオシドに変換する知見はいくつか報告されている。多くの場合適当なリボース供与体、たとえばリボヌクレオシドやリボヌクレオチド類の存在を必要とするが、グルコースのような適当な炭素源があれば良い場合もある。

演者らは *Bacillus subtilis* のイノシン (HxR) 生産性人工変異株が、外部から与えられたヒポキサンチン (Hx) を高収率で HxR に変換することを知った。この性質は HxR 生産菌に共通して認められるもので、一方親株にはほとんど認められない。本報では主として HxR 生産菌を用いて Hx→HxR への変換 (以後“salvage”合成と呼ぶ) と、グルコース、窒素源などからの HxR 生成 (“de novo”生成と呼ぶ) との関連、“salvage”合成とは表裏の関係にある HxR→Hx 分解能などについて若干検討した結果を述べる。また同一親株から変異誘導された各種ヌクレオシド (“de novo”) 生産株について、各種の天然核酸系塩基のリボヌクレオシドの変換能を比較検討した結果を併せ報告する。

方 法

使用菌株は *Bacillus subtilis* No. 20932 株 および本株から変異誘導された HxR, HxR+Hx, テデノシン, キサントシン, オロチデン, AICA-riboside の各 (“de novo”) 生産株。また *Bacillus subtilis* Marburg 株から得た HxR+Hx 株, *Bacillus subtilis* No. 11062 株から誘導した HxR 生産株。培養法は growing culture の場合は 500ml 入り坂口フラスコに培地 20ml を入れ、31.5°C で往復振盪培養。培地はグルコース・カザミノ酸、塩化アンモニウムにコハク酸ア

ンモニウムまたは L-ピログルタミン酸アンモニウム (場合によっては後二者の代りに CaCO₃ 添加) を添加したものを主体に、各変異株の growth factor を各ヌクレオシドの “de novo” 生成に至適になる量加えた。non-proliferating cell suspension の場合は 20×200mm 試験管に菌体を含む反応液 6.0ml を入れ、31.5°C で往復振盪。反応液はグルコース・塩類から成り、CaCO₃ を少量加えて pH を調節した。菌体は growing culture 約 30 時間培養のものを数回洗滌後使用した。核酸塩基を加える場合は 20mM の濃度になるように添加した。各塩基、リボヌクレオシドの定性、定量は数種の溶媒を用いるペーパークロマトグラフィー、沪紙電気泳動法などの組合せにより相互に分離後、U.V. 吸収曲線測定、オルシノール反応、U.V. 吸光度などから求めた。定量の際には既和濃度の塩基、リボシド溶液について同様の操作を行ない、標準とした。HxR→Hx 分解能は上記の休止菌体を用い、40mM の HxR と各種条件で反応させ、生成する Hx 量から求めた。

結果および考察

まず HxR 生産菌の一つ、No. 11023 株を用いて growing culture で検討した。本菌は前述の培地を用いる growing culture で約 20mM の HxR を “de novo” に生成するが、このとき Hx を添加すると HxR は著しく増加する。たとえば 3g/l (ca. 22mM) の Hx を培養開始後 24 時間目に添加すると、以後 Hx は順次減少し、添加後 48 時間の培養では 100% HxR に変換する。添加後の各時期で消失 Hx と、Hx 添加により増量した部分の HxR のモル比は 1 ± 0.05 の範囲にあり、Hx は消失と共に定量的に HxR に変わることを知った。なお Hx 添加量、添加時期について若干検討した。

本菌は non-proliferating cell suspension の状態

(60)

で HxR “de novo” および “salvage” 合成を強力に行なう。すなわち両者共約30時間位まで時間の経過に対し定速度で進行する。また “salvage” 合成には lag time がほとんど認められない。反応条件の設定後、主として反応液構成々分の両者に対する影響をみた。顕著な現象としては NH_4^+ および PO_4^{3-} の効果が挙げられる。すなわち反応液から NH_4^+ を除去すると予想されるように “de novo” 生成はほぼ完全に停止するが、“salvage” 合成はきわめて良好に進行する。一方 PO_4^{3-} を除去すると “de novo” 生成は著しく促進されるが、“salvage” 合成は相当抑制される。面白いことにこれらの各条件下で生成する全 HxR 量 (“de novo” + “salvage”) はほぼ一定の水準にあり、したがって十分に供給能のある リーボス 部分を “de novo” 生成と “salvage” 合成とが相互に奪い合っているように見える。

No. 11023 株は $\text{HxR} \rightarrow \text{Hx}$ 分解能を有している。ただし親株のそれに比べて弱い。しかしこの分解能は HxR を “de novo” に生成する条件、または “salvage” 合成が起る条件下では顕在化しない。この現象は $\text{Hx} \rightarrow \text{HxR}$ 変換と $\text{HxR} \rightarrow \text{Hx}$ 分解のバランスで分解能

が顕在化したり、しなかったりすると解釈することもできる。

No. 11023 株以外の各種親株から得られた HxR 生産菌は、共通して $\text{Hx} \rightarrow \text{HxR}$ 変換能を強力に有して居り、HxR 生産菌の一つの特徴と考えられる。また $\text{HxR} + \text{Hx}$ 生産株では活性は弱いこともわかった。

最後に No. 20932 株および本株から得られた各種のヌクレオチシド “de novo” 生産株について Hx を含めて各種天然塩基に対するリボヌクレオシドへの変換能を比較検討した。一般に自身が “de novo” に生成するヌクレオシドに含まれる塩基をリボヌクレオシド化する活性は他の菌株に比べやや強力である傾向があるが、活性自体は HxR 菌の $\text{Hx} \rightarrow \text{HxR}$ 変換に比べはるかに弱い。 $\text{Hx} \rightarrow \text{HxR}$ 変換は HxR 菌にのみ特徴的に強力に認められた。また No. 20932 株自身アデニンから相当量のアデノシンを、AICA から少量の AICA-riboside を生成する性質を有し、この性質は一般に各変異株に保存されていた。また興味ある多くの塩基、リボヌクレオシド間の interconversion が認められた。