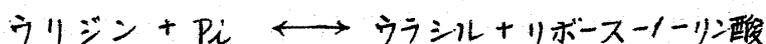


144 ユリジンホスホリラーゼの性質とその応用

(味の素中研) ○宇多川隆, 小林忠雄, 山中茂

1. 目的 酵素を有機合成のプロセスに応用しようとする試みは、近年ますます盛んとなり、その幾つかは実用化されている。これらの酵素反応の多くは、既知酵素を巧妙に利用して新しい反応に応用しているものであり、既知酵素には、まだまだ未開拓な反応が認められていることを示唆している。

ユリジンホスホリラーゼ(以下 *UPase*) は1950年代に見い出されている古典的な酵素であり、次の反応を触媒する。我々は、本酵素が60℃という高温下に至適温度を有し



かつ高温下でも長時間に渡って安定に触媒作用を示すことを明らかにすると同時に、高温下では、従来アデニン酸分解を受けにくいとされていたウラシルアラビノシド(Ara-U)にも作用して容易にアラビノース-1-リン酸(Ara-1-P)を生成することを報告している。^①このように、既知酵素を従来の反応条件とは異なる場で作用させることにより、新しい能力を引き出し得ることを示したが、本報では、*Enterobacter aerogenes* AJ11125より調製した *UPase* を用いて、高温下における酵素の触媒的性質を検討したので報告する。又、本酵素を用いると、各種のピリミジンヌクレオシド類が合成される知見を得たので、合わせて紹介する。

2. 方法 ① 菌体培養: 各種バクテリアの-白金耳を、0.5%酵母エキスを含むブイヨン中に接種し、24時間振とう培養する。② 酵素調製法: 前報^①に従って調製したので略記する。*Enterobacter aerogenes* AJ11125 湿潤菌体を、リン酸バッファー(pH 7.0, 50 mM)に懸濁し、超音波処理したのち、上清を熱処理(60℃, 1時間)する。その上清を硫酸分画(0-60%)し、遠析後、DEAE-セルロースにて層析し、*UPase* 画分を集めて濃縮する。③ 酵素反応: ヌクレオシド(10 mM), リン酸バッファー(pH 8.0, 100 mM), 菌体(湿度50%)又は、*UPase* (0.01~0.5u)を60℃, 5~60分反応後、生成する塩基を高速液体クロマトグラフィーにて定量した。④ ヌクレオシド合成: 糖リン酸エステル(1%), ピリミジン塩基(0.2%)を上記菌体又は、*UPase*存在下、60℃ 3~15時間作用させ、*Sephadex G-10* を用い、水にて層析し、得られるヌクレオシド画分を集めて濃縮し、結晶を得る。

3. 結果 ① *UPase* の分布: 各種のトリプカルチカーを用いて *UPase* の分布を調べたところ、*Bacterium cadaveris*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia* 等に広く分布していることを確認した。属による明確な区分はできなかったが、*Bacillus* や *Alcaligenes* 属に *UPase* を検出できない株の存在も認められた。

シンポジウム(アミノ酸核酸)

② 基質特異性: 表-1に示した各種ウリジン類縁化合物に, UPase を60℃にて作用させ ウリジンを100とする相対活性を求めた。2'-デオキシ化合物は, 約20%の活性を示しアラビノシドに対しても10%の活性を示すことが明らかになった。

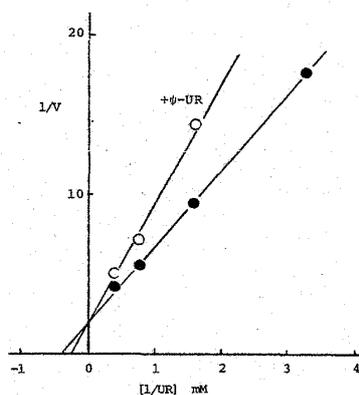
(表-1)

Compounds	UR	Ara-U	dUR	TdR	CR	ψ-UR
Velocity	100	10	18	22	0	0

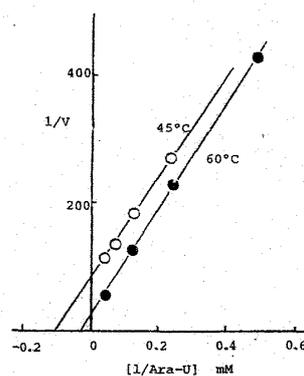
一方, 4位の水酸基が, アミノ基に代ったシチジン(CR)には全く作用せず, 4位の水酸基は活性発現には必須であると考えられる。又, シュードウリジン(ψ-UR)にも作用しないところから, UPase は C-N結合のみを分解することが示された。このψ-URは, 図-1に示したように, URの分解を拮抗的に阻害しており, 良好な阻害剤と考えられる。

③ 酵素に及ぼす温度の効果: 60℃という高温環境下で酵素反応を行, た場合の基質と酵素の関係を, ラインワイバーバープロットによって検討した。図-2に示したように, 基質Ara-Uに対するUPaseの V_{max} は60℃では45℃の約3倍違くなっているが K_m 値は, 95mM/45℃及び25mM/60℃と高温下では大きくなっており, 熱による酵素タンパク構造の変化が示唆された。

(図-1)



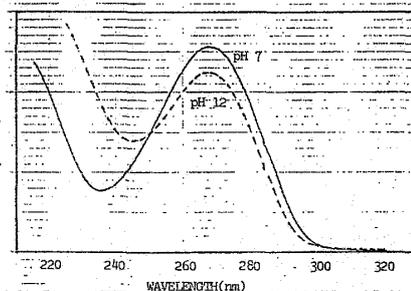
(図-2)



④ ヌクレオシド合成: アラビノース-1-リン酸とチミンより, 抗ウイルス活性を有するチミンアラビノシド(Ara-T)を合成した。本化合物はAra-U(30mM)とチミン(10mM)よりUPase存在下で触媒される糖交換反応によっても合成される(対チミン収率30%)ことを確認しており, ピリミジンヌクレオシドの立体特異的合成にUPaseが利用できることが示された。図-3に得られたAra-TのUVスペクトルを示す。

又, ウリジン又はアデニンより容易に調製されるリボース-1-リン酸と5-フルオロウラシル(5-FU)とより, 約70%(対5FU)の収率で制がん作用が知られている。5-フルオロウリジン(5FUR)が合成された。本化合物は, 5FUよりも *Comamonas*属に対し強い抗がん作用を示しリボシル化による活性化が示唆された。

(図-3)



① アミノ酸核酸シンポジウム (1980. 東京)