

135

## ウリジン醜酵に関する研究

(武田薬品・研開本部、\*医薬事業部) 士居宗晴、○朝日知、常見裕、  
秋山峻一、中尾義雄\*

ピリミジン系化合物は、各種医薬品などの製造原料として有用な物質である。われわれは、微生物の代謝制御機構を人為的に改変することによって、ピリミジン系化合物を大量に生成蓄積する変異株の育成を試みてきた。ここでは、Bacillus subtilis のウラシルアナログ耐性株によるウリジンの製造プロセスの開発経緯について述べるとともに、その過程で得られた各種変異株の特性を手掛かりとして解明することができた B. subtilis のピリミジンヌクレオチド生合成の調節機構に関する 2、3 の知見を紹介したい。

1) 生産菌の育種: B. subtilis No. 122 株からウラシルアナログ耐性株を分離した。ウリジン生産量とアナログ耐性度との間には、密接な関係が認められ、No. 122 株のアナログ耐性度を段階的に高めることによって、46mg/ml のウリジンを生産しうる No. 508 株が得られた。しかし、この株では、ウリジンの他にウラシルの副生が認められたので、次に No. 508 株からウリジンの分解に関与するウリジンホスホリラーゼの欠損株を誘導したところ、著量のウリジン (55mg/ml) を選択的に蓄積する No. 556 株が得られた。

2) UMP 生合成の調節機構: B. subtilis の UMP 生合成系酵素群は、培地にウラシルやシチジンを添加することによって抑制されることが知られている。しかし、この場合、培地に添加されたシチジンは脱アミノ反応によって、容易にウラシル関連物に変換されるので、抑制に関与するより直接的な因子がウリジン誘導体であるのか、シチジン誘導体であるのかを区別することが困難である。そこで、B. subtilis のシチジンデアミナーゼ欠損株を用いて、ピリミジンヌクレオチド生合成の制御機構を調べた。UMP 生合成系の諸酵素は、培地へのウラシル添加によって抑制され、また、初発酵素カルバミルリン酸合成酵素は、ウリジンヌクレオチドによって阻害された。一方、CTP 合成酵素は、シチジンの添加によって抑制され、シチジンヌクレオチドによって阻害された。これらの結果から、UMP 生合成酵素群は、ウリジン系化合物によって、また CTP 合成酵素は、シチジン系化合物によって、それぞれ制御されていることが明らかになった。

3) ウリジンの蓄積機構: No. 556 株のウリジン蓄積機構を明らかにするために、UMP 代謝経路の各酵素活性の変動を調べた。その結果、ウリジン生産株では、UMP 生合成系諸酵素のウラシル関連物による抑制と、カルバミルリン酸合成酵素のウリジンヌクレオチドによるフィードバック阻害が遺伝的に解除されていて、各酵素の活性量が野生株の 16 - 32 倍に上昇していることが明らかになった。一方、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼおよびヌクレオチダーゼ活性には、野生株と変異株との間で有意の差異が認められなかった。

4) ウラシルアナログ耐性化遺伝子 (pyrR) のクローニング: 上述のように、ウリジン生産菌 No. 556 株は、各種ウラシルアナログに耐性を示す。そこで、この耐性に関与する遺伝子 (pyrR) を pBR322 にクローニングし、E. coli C600 株をウラシルアナログ耐性に形質転換するプラスミド pYR100 を得た。このプラスミドは、約 10 kb の挿入断片をもち、E. coli C600 株由来の各 pyr 変異株を野生型に形質転換した。次に、pYR100 の挿入断片により B. subtilis 168 株を形質転換したところ、ウラシルアナログ耐性株が高頻度で出現した。さらにサブクローニングを行ない pyrR 領域と pyr 遺伝子クラスターとの関係を調べたところ pyrR 領域は、pyr 遺伝子クラスター中央部の pyrA および pyrD 遺伝子を含む約 5.5 kb の DNA 断片内に存在した。この DNA 断片で B. subtilis 168 株を形質転換して得られた TFB16 株は、培地中に多量のウラシルおよびウリジンを蓄積した。また、この形質転換株では、UMP 生合成酵素群のウラシル関連物による抑制と、カルバミルリン酸合成酵素の UMP によるフィードバック阻害の解除が観察された。