

〔醸酵工学 第57巻 第4号 187-194. 1979〕

## *Aspergillus niger* の 5'-ホスホジエステラーゼ 高生産変異株の造成

藤島鉄郎・山根良太・鬼柳徹雄・内田一生・吉野 宏

ヤマサ醤油(株)研究所

5'-Phosphodiesterase hyperproductive mutants of *Aspergillus niger*. FUJISHIMA, T., R. YAMANE, T. KIYANAGI, K. UCHIDA, and H. YOSHINO (*Research Laboratory of Yamasa Shoyu Co., Ltd., Choshi 288*) *Hakkokogaku* 57: 187-194. 1979.

A strain of black *koji*-mold, which hyperproduced 5'-phosphodiesterase, was isolated from soil. This strain was identified as *Aspergillus niger* by its taxonomical characteristics.

An 8-azaadenine and 5-fluorocytosine resistant mutant FS-44 was successfully obtained from the above strain by treatments with ultraviolet light and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine. The resistant strain showed 5.5 times higher activity of 5'-phosphodiesterase than the parent strain, though it resembled the parent strain in appearance.

Phosphomonoesterase in the resistant strain was inactivated by heat treatment at 80°C, pH 4.8 for 12 to 24 sec in 0.5% sodium laurylsulfate solution. 5'-phosphodiesterase solution from which phosphomonoesterase activity had been eliminated by this treatment was applied to an RNA digest prepared by nuclease P<sub>1</sub> digestion. The 5'-phosphodiesterase treatment diminished the dinucleotide fraction and gave 4% increase of the 5'-mononucleotide fraction.

国中らによって工業用 *Candida* 属酵母核酸中には、3'→5'ホスホジエステル結合の他に数パーセントの2'→5'ホスホジエステル結合が存在し、この2'→5'ホスホジエステル結合はヌクレアーゼ P<sub>1</sub> に抵抗性を示し、従ってヌクレアーゼ P<sub>1</sub> による酵母リボ核酸の分解液中には、2'→5'ジヌクレオチドが残存することが報告されている<sup>1,2)</sup>。さらに、酵母からリボ核酸を熱食塩水で抽出する際に、高温で pH の低い条件ほど、3'→5'ホスホジエステル結合が2'→5'ホスホジエステル結合に転移しやすく、しかもこの転移のしやすさに塩基の種類が関係していることが明らかになった<sup>3)</sup>。著者らは、この2'→5'ホスホジエステル結合を特異的に切断する 5'-ホスホジエステラーゼ（以下 5'-PDase と略称する）を糸状菌920菌株について固体培養を行い活性を測定した結果、5'-PDase 高生産株は黒麹菌に限定され、これら菌株のうち *Aspergillus niger* AHU 7117 の生産する 5'-PDase の酵素的性質について前報で報告した<sup>4)</sup>。今回さらに 5'-PDase のみ

を高単位に生産し、共存するホスホモノエステラーゼ（以下 PMase と略称する）の生産量の低い黒麹菌を広く自然界に検索した結果、千葉県小見川町の土壌より分離した M-471-2 が、この条件に適合する菌株であることが判明した。この M-471-2 を親株として各種変異処理を行い、5'-PDase 高生産変異株の検索に核酸関連代謝拮抗物質である塩基アナログの 8-アザアデニンおよび 5-フロロシトシン耐性菌の取得方法を採用したところ、優良菌株として FS-44 を得、この菌株の生産する 5'-PDase による 2'→5'ジヌクレオチドの分解条件について検討を加えたので報告する。

### 実験方法

**土壌より黒麹菌の分離** 各地より採取した土壌 1 g を秤量し、これに殺菌水 10ml を加え 28°C, 30 分間振とう後、上澄液 0.2ml をグルコース・ペプトン培地のシャーレに植菌し、28°C, 4 日間培養した。培養終了後、黒麹菌のみをグルコース・ペプトン寒天培

地に釣菌した。

**分離用培地** グルコース 5%, ポリペプトン 0.05%, リン酸 1 カリウム 0.05%, リン酸 2 カリウム 0.5%, 塩化カルシウム 0.04%, 硫酸マグネシウム 0.04% から成るグルコース・ペプトン培地を分離用培地とした。

**酵素生産培地および酵素液の調製** ふすま 8 g を 200 ml 容三角フラスコに秤量し, 水 5 ml を加え充分にかくはん, 殺菌後植菌し, 28°C, 3 日間培養した。この固体麩に 80 ml の水を加え, 28°C, 1 時間振とう抽出後ろ過し, ろ液を酵素液とした。

**5'-PDase 活性の測定** 12.5 mM アデニリル (2'→5') アデノシン溶液 (pH 4.8) 0.2 ml に酵素液 0.2 ml を加え, 70°C, 30 分間反応後, 反応液 0.05 ml を試料として 3% 酢酸溶液を溶媒としてろ紙電気泳動を行う。生成したアデノシン, 5'-アデニル酸および基質のアデニリル (2'→5') アデノシンのスポットを切り抜き, 0.1 N 塩酸 6 ml で抽出した。各スポットの OD<sub>260</sub> を測定後, その吸光値よりアデニリル (2'→5') アデノシンの分解率を算出した。酵素活性の表示は, 上記条件下で 1 マイクロモルを 1 分間で分解する酵素量を 1 単位とした。

**PMase 活性の測定** 25 mM 5'-シチジル酸ナトリウム (pH 4.8) 1 ml, 0.028 M ベロナール緩衝液 (pH 4.8) 2 ml に酵素液 1 ml を加え, 60°C, 30 分間反応する。反応 0 分および 30 分に反応液 1 ml をとり, 生成した無機リン酸をアレン法<sup>5)</sup>で測定した。反応中に生成した無機リン酸より, 1 分間に 1 マイクロモルの基質を分解する酵素量を 1 単位とした。

#### 人工変異株の造成

1) 紫外線照射 親株として黒麹菌 M-471-2 株を用い 0.85% 食塩水に孢子を懸濁 (10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 孢子/ml) し, 10W の UV ランプを用いて 30 cm の距離から 90 秒照射した。この時の killing ratio は 99.12% であった。

2) *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) 処理 孢子懸濁液 20 ml に 2 mg/ml の NTG 溶液 20 ml を加え, 室温で 2 時間放置後, 遠心分離によって孢子を集め, 滅菌水で 2 回洗浄し最後に滅菌水で原容に戻した。この NTG 処理による killing ratio は, 34% であった。

**界面活性剤** 供試した界面活性剤は日本油脂(株)製のもので, 陽イオン系界面活性剤としてはカチオン P およびカチオン F2-50, 陰イオン系界面活性剤としてニューレックス・ペースト W, 両性界面活性剤として

アノン BF およびアノン LG, 非イオン系界面活性剤としてノニオン HS-210 およびノニオン NS-260 である。

#### 実験結果

**各種黒麹菌による 5'-PDase 生産能の分布** 土壌 733 検体より 3,556 菌株の黒麹菌を分離し, 5'-PDase 生産能が高く, その上共存する PMase 活性の低い菌株を取得した結果を Table 1 に示した。前報<sup>4)</sup>で優良菌株として選定した *A. niger* AHU 7117 は, Table 1 より明らかなように, 共存する PMase 活性が高く, このため PMase の除去に煩雑な操作を必要とした。新たに土壌より分離した黒麹菌のうち Table 1 の代表的 7 菌株は, いずれも 5'-PDase 活性は *A. niger* AHU 7117 より 2~4 倍高い。特に 5'-PDase 活性 16.00 単位/ml, PMase 活性 0.92 単位/ml を示した黒麹菌 M-471-2 株を優良菌株として選定し, 以後の変異処理等の親株とした。

**5'-PDase 生産能の高い人工変異株の造成** 千葉県香取郡小見川町の土壌より分離した黒麹菌 M-471-2 を親株とし, 所定の方法で紫外線照射を行った。この紫外線照射液を 4 mM 8-アザアデニンおよび 0.01%  $\alpha$ -naphthyl-5'-adenylate 含有グルコース・ペプトン培地に植菌した。その結果 8-アザアデニン耐性菌の出現率は 0.028% であった。このようにして得た 8-アザアデニン耐性菌 2,700 株の 5'-PDase

Table 1. Distribution of 5'-PDase and PMase activity in black koji-molds.

Strain	Enzyme activity (units/ml)	
	5'-PDase <sup>a)</sup>	PMase <sup>b)</sup>
<i>A. niger</i> AHU 7117	4.080	5.947
M-10-4	9.523	6.324
M-33-4	9.727	4.323
M-121-8	9.942	0.640
M-123-3	9.918	0.915
M-244-1	16.317	1.500
M-471-2	16.367	0.920
M-593-3	16.947	3.950

<sup>a)</sup> 5'-phosphodiesterase activity was based on measurement of the amount of adenosine and 5'-AMP formed by hydrolysis of adenylyl (2'→5') adenosine at 70°C, pH 4.8, for 30 min.

<sup>b)</sup> Phosphomonoesterase activity toward 5'-CMP was assayed by measuring the amount of inorganic phosphate liberated at 60°C, pH 4.8, for 30 min.

Table 2. 5'-PDase production by mutants derived from *A. niger* M-471-2.

Strain	Mutagen	Characteristic	Activity (units/ml)	
			5'-PDase	PMase
M-471-2 (parent)		Wild	16.367	0.920
↓	uv			
R-1227		8-aAde <sup>r</sup>	23.000	1.130
↓	uv			
FC-978		8-aAde <sup>r</sup> , 5-FC <sup>r</sup>	29.972	1.240
↓	NTG			
FS-44		8-aAde <sup>r</sup> , 5-FC <sup>r</sup>	89.837	1.720

活性を測定した結果、R-1227株が親株の1.4倍の活性であった。次にこのR-1227株にさらに紫外線照射を行い、2 $\mu$ g/mlの5-フロロシトシン含有グルコース・ペプトン培地に対する耐性菌のスクリーニングを続けた。なお5-フロロシトシン耐性菌の出現率は処理孢子数の4.5 $\times$ 10<sup>-5</sup>であった。この5-フロロシトシン耐性菌約1,500株中、5'-PDase活性の最も高い菌株は、Table 2に示したようにFC-978で親株の約1.8倍に5'-PDase活性が増強された。この8-アザアデニンおよび5-フロロシトシンの両耐性菌のFC-978にNTG処理を行い、生育良好な菌株を選択し、5'-PDase生産能の上昇した菌株について単孢子分離により菌株の純化を行った。その結果、5'-PDase生産能が親株の5.49倍に増強されたFS-44を得た。一方、FS-44の5'-PDaseに共存するPMase活性は、1.72単位/mlで親株の1.87倍であった。なお、分生子頭が球形で黒褐色である本菌M-471-2は、Black *Aspergillus* の分類<sup>6,7)</sup>に従えば、梗子が2段で分生子は直径5 $\mu$ m以下で成熟すれば著しい小突起を有することより、*Aspergillus niger*に属する菌株と同定した。親株および人工変異株FS-44の形態的特徴、生育最適温度およびpHにはほとんど差異は見られなかった。

**各種 PMase 阻害剤の検討** 黒麹菌の生産する5'-PDaseを酵母RNAのヌクレアーゼP<sub>i</sub>分解液に適用し、2'→5'ホスホジエステル結合を分解して5'-ヌクレオチドの収量を上げる場合、5'-PDaseに共存するPMase活性は、5'-PDaseの約0.05%以下、すなわち5'-PDase活性が100単位/mlならばPMase活性は0.05単位/ml以下に低下させることが必須条件であることを著者らは経験的に明らかにしている。酸性PMaseの阻害剤としては、現在のところ

フッ化ナトリウム<sup>8)</sup>、2-ヒドロキシカルボン酸類<sup>9)</sup>、モリブデン酸およびタンゲステン酸<sup>10,11)</sup>、グライコール類<sup>12)</sup>等が知られている。造成菌FS-44の酵素液について上記PMase阻害剤の作用を検討したところ、PMaseに阻害作用を示すものは、同時に5'-PDaseに対して同程度の阻害作用が見られた。また、フロロリン酸<sup>13)</sup>およびN-ブロムスクシンイミド(NBS)<sup>14)</sup>は、同濃度においてPMaseよりも5'-PDaseをより強く阻害した。すなわちNBSの場合、PMaseは250 $\mu$ M添加では全く作用を受けなかったのに対して、5'-PDaseは約99%阻害され、PMase freeの5'-PDaseを調製することはできなかった。

**熱処理による PMase の失活** 次に両酵素の耐熱性の差より、5'-PDaseに共存するPMaseの除去が可能かどうかを検討した。すなわち、FS-44より調製した酵素液(5'-PDase 135.85単位/ml, PMase 4.15単位/ml)をpH 5.0に調整後、60~90 $^{\circ}$ C、1~30分間の熱処理後、両酵素の残存活性を測定した結果を示したのがTable 3で、5'-PDaseよりもPMaseの方が耐熱性の弱いことが判明した。しかしこれらの熱処理でも5'-PDaseに対するPMaseの活性は0.27%であり、当初目的とした0.05%以下には到達しなかった。FS-44株のふすま麴より調製した酵素液を濃縮後アセトンを添加して得られた部分精製酵素液をDEAE-セルロースカラムで分画したところ、PMase活性は4種類に分別され、この黒麹菌の生産する菌体外PMaseはmultiformであることが判明し、この4種類のPMaseを同時に失活させる処理方法を見いだすことは容易ではないと予想された。

**界面活性剤存在下における PMase の熱失活** 著者らは、しょうゆ中のホスファターゼの研究で、

Table 3. Thermostability of 5'-PDase and PMase.

Heat treatment		5'-PDase		PMase	
Temp(°C)	Time(min)	Units/ml	R.A.(%) <sup>a</sup>	Units/ml	R.A.(%) <sup>a</sup>
60	30	42.97	31.63	1.07	43.67
70	5	109.91	80.31	0.69	28.16
80	3	111.80	82.30	0.34	13.88
90	1	112.27	82.64	0.30	12.24
Control		135.85	100.00	2.45	100.00

Enzyme solutions were incubated at temperatures from 60 to 90°C, for from 1 to 30 min at pH 5.0, and residual activities were assayed and expressed as a percentage of the original activities.

<sup>a</sup> R.A: Relative activity.

Table 4. Effect of surfactants on 5'-PDase and PMase in heat treatment.

Surfactant	Remaining activity(%)	
	5'-PDase	PMase
Cation P	74.46	6.66
Cation F2-50	83.71	7.65
Newlex Paste-W	88.55	2.61
Anon BF	80.08	27.20
Anon LG	76.44	6.89
Nonion HS-210	79.18	24.97
Nonion NS-260	78.25	26.95
None	81.38	24.36

Surfactants were added at final concentration of 0.1%. After heat treatment at 70°C, for 15 min. pH 4.8, remaining activities were determined with aliquots of the incubation mixtures and expressed as a percentage of the original activity. Surfactants were purchased from Nippon Oil & Fat Co. Ltd.

しょうゆの火入れ時に界面活性剤を添加することにより、ホスファターゼのみを特異的に失活させることを見いだしたので、<sup>15)</sup> 本酵素についても界面活性剤の添加効果について検討した。各種界面活性剤の添加量を0.1%とし、pH 4.8, 70°C, 15分間の熱処理を行った結果が Table 4 で、PMase の失活率の高いものは、陽イオン系ではカチオンP, カチオンF2-50, 陰イオン系ではニューレックス・ペーストW, 両性界面活性剤ではアノンLGで、このうち陰イオン系界面活性剤ニューレックス・ペーストWが最も高いPMase失活率を示した。この陰イオン系界面活性剤ニューレックス・ペーストWの主成分は、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムなので、各種スルホン酸および硫酸化合物の熱処理によるPMase失活時の添加効果について検討した結果、Table 5 に示したように、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムと同程

Table 5. Effect of sulfonate and sulfate compounds on 5'-PDase and PMase in heat treatment.

Sulfonate & sulfate compound	Remaining activity	
	5'-PDase	PMase
None	93.73	45.78
Newlex Paste-W	98.71	1.26
Sodium sulfate	98.35	42.17
Sodium thiosulfate	69.89	39.75
Sodium dodecylbenzenesulfate	89.84	0.96
Sodium laurylsulfate	100.03	1.17
Sodium chondroitinsulfate	104.51	42.76
Sodium p-toluenesulfate	105.21	57.24
Sodium m-sulfobenzoate	97.46	52.23
1-Amino-2-naphthol-4-sulfonate	16.25	50.95

Sulfonate & sulfate compound concentration: 0.1%  
Heating conditions: pH 4.8, 70°C, 10 min.

Table 6. Effect of sodium laurylsulfate on 5'-PDase and PMase in heat treatment.

Heat treatment		5'-PDase		PMase	
Temp. (°C)	Time (sec)	Activity (units/ml)	Relative activity	Activity (units/ml)	Relative activity
90	12	61.89	53.56	0.051	2.25
	24	41.84	36.21	0.028	1.23
	48	32.71	28.31	0.025	1.01
85	12	87.29	75.53	0.032	1.41
	24	88.16	76.30	0.024	1.06
	48	65.98	57.10	0.012	0.53
80	12	113.93	98.60	0.030	1.32
	24	112.60	97.45	0.033	1.45
	48	103.27	89.37	0.023	1.01
Control		115.55	100.00	2.270	100.00

Sodium laurylsulfate concentration: 0.5%

度の PMase 失活率を示し高い 5'-PDase の残存率を示した化合物は、ラウリル硫酸ナトリウムであった。次にこのラウリル硫酸ナトリウムを用いて、高温、短時間の熱処理を行い、PMase の失活条件を検討したのが Table 6 である。その結果、ラウリル硫酸ナトリウム 0.5% 存在下で酵素液を 80°C、12~24 秒間熱処理することにより、0.05 単位/ml 以下の PMase 活性となり、5'-PDase の残存酵素活性は 98% 程度で、目的とした 5'-PDase の 0.05% 以下の PMase 活性ということに適合する良好な結果が得られた。<sup>16)</sup>

**酵母 RNA のヌクレアーゼ P<sub>i</sub> 分解液への 5'-PDase の適用** FS-44 のふすま培養酵素液にラウリル硫酸ナトリウムを 0.5% 添加後、80°C、pH 4.8、12 秒間熱処理した PMase free の 5'-PDase を、酵母 RNA のヌクレアーゼ P<sub>i</sub> 分解液に添加し、pH 4.8、70°C、3 時間分解した。なお、酵母 RNA 1g 由来の 2'→5' ジヌクレオチドを分解するのに、5'-PDase を約 70 単位添加することが必要である。この酵素量は、2'→5' ジヌクレオチドを分解に必要な理論酵素量より十数倍多くなっているが、これは RNA のヌクレアーゼ P<sub>i</sub> による分解によって生成した 5'-ヌクレオチドが 5'-PDase に対して生産物阻害をしているためである。5'-PDase 反応液を DEAE-セファデックス A-25 の 7M-尿素カラム処理を行い、分解生成物の分別を行った。<sup>17,18)</sup> すなわち、7 M 尿素を含む 0.02 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で緩衝化した DEAE-セファデックス A-25 (径 20mm、長さ 400mm) カラムに分解液を吸着し、7 M 尿素含有下で食塩

0.14~0.20M (pH 7.6) の濃度勾配溶出法 (全溶出 1 l) を行った後、溶出剤を 0.5 N 水酸化ナトリウムに切り換え、オリゴヌクレオチドを溶出した。カラムの溶出順序に従い、ヌクレオシド、5'-モノヌクレオ

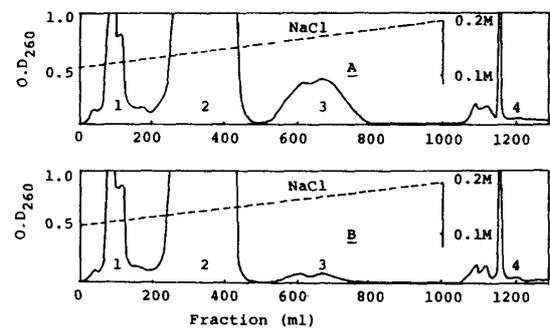


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-25 7M Urea column chromatography of nuclease p<sub>i</sub> digest of technical grade RNA (A) and the digest treated further with *A. niger* FS-44 5'-PDase (B). Each digest was applied to a 2×40cm column of DEAE Sephadex A-25 equilibrated with the urea Tris buffer system containing 7 M urea, 0.02M Tris HCl buffer (pH 7.6) and 0.14M NaCl. The column was then connected to a 1,000-ml linear gradient of 0.14-0.20M NaCl in the urea Tris buffer. After the linear gradient, elution was continued with 0.5 N NaOH. Ten-ml fractions were collected at a flow rate of 2ml/min. The peaks 1, 2, 3 and 4 were confirmed to be nucleoside, mono-nucleotide, dinucleotide and oligonucleotide fractions, respectively.

チド、ジヌクレチド最後にオリゴヌクレオチドに分解され、全紫外吸収 (260nm) に対する各フラクションの割合を算出した。Fig. 1 に示したように、RNA のヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 分解液中中に存在した 2'→5' ホスホジエステル結合を含むジヌクレオチド区分が、黒麹菌の 5'-PDase を作用させることによりほとんど消失した。すなわち、5'-PDase 作用後分析した結果、5'-モノヌクレオチドおよびヌクレオシドが各々 3.81% および 0.64% 増加し、一方ジヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドが各々 4.28% および 0.22% 減少し、5'-モノヌクレオチドの収率向上という目的にはば到達することができた。

### 考 察

酵母 RNA より 5'-ヌクレオチド類を製造する方法としては、酵母 RNA の酵素分解法と化学法 (酵母 RNA を化学的にヌクレオシドまで分解し、あらためてその 5' 位をリン酸化) の 2 つの方法があり、それぞれ工業化されている。前者の場合、酵母より熱水抽出法で調製した RNA 中には、3~5% の 2'→5' ジヌクレオチドが存在し、5'-ヌクレオチド収率を低下させる原因となっている。しかし、このような 2'→5' ホスホジエステル結合を含まない無変性 RNA の酵母よりの抽出法も開発されている。<sup>19,20)</sup> この 2'→5' ジヌクレオチドを分解する酵素の高単位生産菌が黒麹菌にのみ局在することを前報において見だし、今回は自然界よりさらに高単位生産菌の分離を試みたわけである。糸状菌以外の微生物について 5'-PDase の生産能を検討したところ、例えば放線菌である *Streptomyces tanashiensis* IAM 0016 の液体培養では、菌体外 0.033 単位/ml、菌体内 0.035 単位/ml (菌体を分離し、超音波破碎後遠心分離、洗浄し、上澄液および洗液を最初の培養液量に希釈したもの) と微量であり、かつグアニリル (2'→5') アデノシンを基質として検討したところ、2'-former の PDase であることが判明した。また *Pichia farinosa* IFO 0193 では、0.016 単位/ml、*Candida polymorpha* IFO 0836 では 0.019 単位/ml、*Rhodotorula glutinis* IFO 0559 では 0.043 単位/ml の活性があったが、いずれも 2'-former の PDase で菌体内酵素であった。さらに *Bacillus subtilis* IAM 1033 では 0.066 単位/ml、*Bacillus cereus* IAM 1110 では 0.041 単位/ml の 2'-former の PDase 活性があったが、酵母の場合と同様に、いずれも菌体内にのみ活性が検出された。以上の

ように、糸状菌以外の微生物、すなわち放線菌、酵母、細菌の各々数菌株について検討したところ、全ての供試菌株に微弱の 2'→5' ジヌクレオチド分解活性が認められたが、黒麹菌とは異なり 2'-former の PDase のみが存在したのが特徴的であった。

5'-PDase 高生産黒麹菌変異株の造成に当たり、著者らは 8-アザアデニンおよび 5-フロロシトシン耐性菌の取得をスクリーニングの手段として用いた。これら核酸関連代謝拮抗物質である塩基アナログに対する耐性菌を取得することにより、各種代謝物の菌体外蓄積量が向上したことが報告されている。例えば、*Bacillus subtilis* のアデニン要求株で、かつアデナーゼ欠損株より低濃度の 8-アザアデニン耐性株を誘導し、親株よりイノシン蓄積量が 50~70% 上昇したという椎尾らの報告、<sup>21)</sup> *Brevibacterium ammoniagenes* KY 13102 株より低濃度 6-メルカプトグアニン耐性のイノシン生産菌を取得したという報告<sup>22,23)</sup> や *Corynebacterium glutamicum* KY 10260 に 2-フルオロアデニン耐性を付与することにより、ヒスチジンと共にアデニンが 0.5~2.0 mg/ml 蓄積を認めた荒木らの報告<sup>24)</sup> がある。本報における黒麹菌の 5'-PDase 高生産変異株の造成は、以下の考え方によって行った。すなわち黒麹菌は、4 mM の 8-アザアデニン単独存在下では生育できない。しかし  $\alpha$ -naphthyl-5'-adenylate 共存下では、5'-PDase の生産性の高い菌株の場合  $\alpha$ -naphthyl-5'-adenylate が分解された結果生ずる 5'-AMP が 8-アザアデニンと拮抗することにより、8-アザアデニンによる生育阻害が解除される。 $\alpha$ -naphthyl-5'-adenylate より 5'-AMP の生成量の多い菌株、すなわち 5'-PDase 生産能の高い菌株のみが、検索培地に生育してくる。この方法によって得た造成菌 R-1227 の 5'-PDase は、親株の 1.4 倍であった。5-フロロシトシンは、強力なガン化学療法剤を開発する目的で合成された一連の含フッ素ピリミジンの一種であり、真菌に対して強い抗菌作用を示すことが報告されている。<sup>25)</sup> この 5-フロロシトシンの真菌に対する選択毒性は、真菌細胞に 5-フロロシトシンが取り込まれると、まず 5-フロロウラシルに脱アミノされる。この 5-フロロウラシルは生体内で FdUMP に変換され、dUMP と拮抗して DNA 合成の律速反応である thymidylate synthetase を阻害<sup>26,27)</sup> するとされているが、5-フロロウラシルの RNA 内への取り込みによる lethal synthesis とも考えられている。<sup>28,30)</sup> 核酸合成に対して阻害作用を示す 5-フロロシトシンの耐性

菌を取得することにより、ある頻度で 5'-PDase 高生産変異株が出現することを期待して検索した結果、5'-PDase が親株の約 1.8 倍に高まった FC-978 を得た。

PMase を含まない 5'-PDase を調製する方法としては、PMase 阻害剤の添加、熱処理等による PMase の失活、さらには PMase の生産性の低い菌株の造成が考えられる PMase 阻害剤について検討した結果、PMase に対して有効な阻害は同時に 5'-PDase をも阻害することが判明した。界面活性剤添加熱処理により 5'-PDase の損傷なしに PMase を除去することが可能となり、5'-モノヌクレオチドの収率向上に貢献できるようになった。低 PMase 生産菌に関しては、現在検討中である。

### 要 約

1. 2'→5' ホスホジエステル結合を分解する 5'-PDase 活性が高くかつ共存する PMase の生産量の低い黒麹菌を土壌より分離し、*Aspergillus niger* と同定した M-471-2 を得た。

2. この M-471-2 に UV 照射、NTG 処理の変異処理を行って得た 8-アザアデニンおよび 5-フロロシトシン耐性菌 FS-44 の 5'-PDase 生産能は、親株の 5.5 倍であった。

3. 5'-PDase 中に共存する PMase のみを特異的に失活させる条件を検討した結果、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム存在下で pH 4.8, 80°C, 12~24 秒間熱処理が最も良好であった。

4. この PMase free の 5'-PDase を、RNA のヌクレアーゼ P<sub>1</sub> 分解液に適用した結果、ジヌクレオチド区分がほとんど消失し、5'-ヌクレオチドの収率が約 4% 上昇した。

### 文 献

- 1) Kuninaka, A., Fujimoto, M., Yoshino, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 597 (1975).
- 2) Kuninaka, A., Fujimoto, M., Yoshino, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 603 (1975).
- 3) Kuninaka, A., Fujimoto, M., Yoshino, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 679 (1977).
- 4) Fujimoto, M., Fujiyama, K., Midorikawa, Y., Fujishima, T., Kuninaka, A., Yoshino, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 737 (1977).
- 5) Allen, R.J.L.: *Biochem. J.*, **734**, 858 (1940).
- 6) 飯塚: 農化, **27**, 801 (1953).
- 7) 飯塚: 農化, **27**, 524 (1953).
- 8) Kay, H.D.: *Biochem.*, **14**, 25 (1938).
- 9) Kilsheimer, G.S., Axelrod, B.: *J. Biol. Chem.*, **227**, 878 (1957).
- 10) Hochster, R.M., Quastel, J.H.: *Metabolic Inhibitors*, Vol. II, 412, Academic Press, New York & London (1963).
- 11) 藤島, 千葉, 吉野: 調味科学, **14**, (4), 1 (1967).
- 12) 坂本, 井倉, 富金原: 理研報告, **43**, 25 (1967).
- 13) Parrish, R.F., Graves, D.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1290 (1976).
- 14) Shimada, Y., Shinmyo, A., Enatsu, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **480**, 417 (1977).
- 15) 藤島, 鈴木, 吉野: 調味科学, **16** (3), 16 (1969).
- 16) 鬼柳, 藤島, 内田, 吉野: 特公昭 52-136989.
- 17) Bartos, E.M., Rushizky, G.W., Sober, H.A.: *Biochem.*, **2**, 1179 (1963).
- 18) Rushizky, G.W., Bartos, E.M., Sober, H.A.: *Biochem.*, **3**, 626 (1964).
- 19) 国中, 藤本, 吉野: 特公昭 52-24118.
- 20) 国中, 藤本, 内田, 吉野: 特公昭 53-12900.
- 21) Shio, I., Ishii, K.: *J. Biochem.*, **69**, 339 (1971).
- 22) Furuya, A., Abe, S., Kinoshita, S.: *Appl. Microbiol.*, **20**, 263 (1970).
- 23) Furuya, A., Kato, F., Nakayama, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 767 (1975).
- 24) Arai, K., Shinjo, S., Nakayama, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 837 (1974).
- 25) Grunberg, E., Titsworth, E., Bennett, M.: *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 566 (1963).
- 26) Heidelberger, C.: *Progre. Nucleic Acid Res. Molec. Biol.*, **4**, 2 (1965).
- 27) Cohen, S.S., Flskd, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R., Lichtenstein, J.: *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **44**, 1004 (1958).
- 28) Harkers, E., Chaudhuri, N.K., Heidelberger, C.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1255 (1959).
- 29) Wilkinson, D.S., Pitot, H.C.: *J. Biol. Chem.*,

248, 63 (1973).

30) 新井: 真菌誌, 15, 26 (1974).

(昭54. 3. 15受付)