

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 9, p. 637~645, 1974]

酵母による CMP とコリンから CDP-コリンの生産*

柄倉辰六郎・荻谷 泰弘**・木村 光

京都大学農学部食品工学科, 京都大学化学研究所**

CDP-choline Production from CMP and Choline by Yeasts

Tatsurokuro Tochikura, Yasuhiro Kariya,** and Akira Kimura

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture
Kyoto University, Kyoto

**Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto

Fermentative production of CDP-choline by yeasts from CMP and choline was investigated. By use of a dried cell preparation of *Hansenula jadinii* IFO 0987, CDP-choline was produced in good yields at high levels of inorganic phosphate under the condition of glucose catabolism. CDP-choline was isolated as its sodium salt by ion exchange column chromatography, and identified by chromatographic and physico-chemical procedures. CDP-choline production by *H. jadinii* was strictly controlled by both cultivation time of cells and pH of the reaction mixture. Long time cultivation resulted in lowering the activity of both choline kinase and CDP-choline pyrophosphorylase of the cells, while the phosphorylation of CMP was not affected by long time cultivation. The optimum conditions for CDP-choline production were as follows: CMP, 20 μ moles/ml; choline, 80 μ moles/ml; glucose, 600 μ moles/ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 μ moles/ml and dried cell preparation 100–200 mg/ml in total volume of 2 ml. Under the optimum conditions, the maximum yield of CDP-choline was more than 13 μ moles per ml.

緒 言

CDP-コリンは Borkenhagen ら¹⁾によって, CTP と P-コリンから酵素的に合成されることが知られたレシチン生合成の重要な中間物質である.²⁾ 本物質は分子内への放射性同位元素の組み入れなど, その用途に応じて有機化学的な方法で調製されているが,^{3~5)} 近年, 微生物による生産も検討され, 報告されている.^{6,7)} 筆

者らはこれまでに酵母の乾燥標品を用いて, CMP と P-コリン, あるいは CMP と P-エタノールアミンから, それぞれ CDP-コリン,^{8,9)} CDP-エタノールアミン^{10, 11)} を醸酵生産する方法について報告してきた.

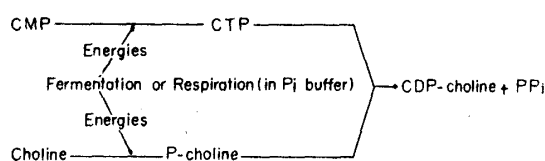
本報においては, P-コリンの代りにコリンを用いて, 収率よく CDP-コリンを醸酵生産する方法を検討した. すなわち, 高濃度の無機リン酸の存在下における糖代謝によって生成するエネルギーをコリンおよび CMP のリン酸化に効率よく利用して CDP-コリンを得ることを目的としている.

このように, リン酸化のエネルギー供給体として, 醸酵のエネルギーを利用する方法は, すでにパン酵母等の乾燥菌体を用いた一連の糖ヌクレオチド醸酵において実施されたものである.^{12~14)} したがって ¹⁴C-コリンを用いることにより CDP-¹⁴C-コリンの生産が可

* 酵母による CDP-コリンの醸酵生産 (IV)
Fermentative Production of CDP-choline by Yeasts (IV).

本報では次の略号を用いた.

CDP-コリン: cytidine 5'-diphosphate choline, CDP-エタノールアミン: cytidine 5'-diphosphate ethanolamine, CMP: Cytidine 5'-monophosphate, P-コリン: Phosphorylcholine, P-エタノールアミン: phosphorylethanolamine, PP_i: inorganic pyrophosphate, FDP: fructose 1,6-diphosphate.



能であり、 ^{32}P -リン酸緩衝液を用いて CMP- ^{32}P -コリンの調製も可能である。まず、各種酵母の乾燥菌体標品を調製しCMP, コリン, 無機リン酸緩衝液, グルコース, Mg^{2+} , を含む反応液とインキュベートして CDP-コリン生産能を比較した。その結果、数種の酵母が比較的多量に該当物質を生成することを認めた。その中でも特に生成量の大きい菌株として *Hansenula jadinii* IFO 0987 を得、本菌を用いて醗酵条件下に生成するシチジンスクレオチドを単離して CDP-コリンと同定した。また、本菌を用いた CDP-コリン醗酵の至適条件を検討したのでそれらの結果について報告する。

実験材料および方法

酵母の培養と乾燥菌体の調製 酵母は前報⁸⁾の方法にしたがって培養したのち、乾燥標品を調製した。

コリンと CMP から CDP-コリン生成能を有する酵母の検索 CMP とコリンから CDP-コリンを生成する酵母の検索は CMP, 20; コリン, 50; グルコース, 400; リン酸緩衝液 (pH 7.4), 200; MgSO_4 , 12 ($\mu\text{moles/ml}$) を含む反応液を標準反応液とし、反応液 2 ml を試験管にとり、被検菌を 100 mg/ml の割合で添加して 28°C で振とう、CDP-コリンの生成量を比較した。

分析法 シチジンスクレオチド類の定量は、ペーパークロマトグラフィー (PPC) によって分離したのち、紫外線吸収画分を切りとり、0.01 N-HCl で 30°C 1 夜抽出した抽出液の 280 nm における吸光度測定により行なった。280 nm におけるシチジンスクレオチドの分子吸光係数、 13×10^3 (pH 2) を用いて、各スクレオチドの濃度を算出した。

コリンは PPC およびシリカゲル G を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分離し、アルカリ性過マンガン酸カリ液を噴霧して黄色のスポットとして検出した。¹⁵⁾

P-コリンおよびP-エタノールアミンの定量の場合には、PPC で分離したのち、Hanes-Isherwood 試薬¹⁶⁾でその所在を確認した。同時に並列して展開したろ紙上の P-コリン、P-エタノールアミンに相当する画分を切りとり、pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液で抽出したのち、*Escherichia coli* から調製した Alkaline phosphatase¹⁷⁾で処理した。本酵素処理によって遊離してくる無機リン酸を Fiske-SubbaRow 法¹⁸⁾で定量し P-コリン、P-

エタノールアミン量とした。

反応生成物の単離 コリンと CMP を用いた反応液から、前報⁷⁾の方法を一部修正して生成物の単離を行なった。反応停止液 (100°C , 3 分間煮沸) の遠心分離上清液に少量の濃塩酸を冷却下において加え、pH を 2 に調整し、生じた白沈を遠心分離して除去した。上清液の 280 nm における吸光度 200 に対し 100 mg の精製活性炭を加えて冷所で 1 夜攪拌しながら核酸関連物質を吸着させた。核酸関連物質を活性炭から 2% アンモニアを含む 50% エタノールで数回溶出したのち、 50°C 以下で減圧濃縮した。濃縮液を pH 8.0 で Dowex-1, X-2 (formate type) カラム (1.8×48 cm) に吸着させ、0.0025 M のギ酸で溶出し、CDP-コリンに相当する画分を単離した。

CDP-コリン画分を再び活性炭に吸着させたのち、上記のアンモニア性エタノールで溶出後濃縮し、Dowex-50 (Na type) カラム (3×7 cm) を通して、水で溶出した。核酸画分を集めて 50°C 以下で減圧濃縮した。濃縮液の着色物質を少量の活性炭で処理して除いたのち、4-5 倍容の 99% エタノールを加えると白濁を生じた。低温に数日間静置して白色板状の結晶を得た。

コリンキナーゼ活性の測定 醗酵条件下における酵母のコリンキナーゼ活性は、標準反応液から CMP を除いて反応したのち、生成する P-コリンを定量して示した。コリンをエタノールアミンに換えて生成する P-エタノールアミンの生成量でも比較した。

定量法 グルコースは除蛋白操作後 Somogyi-Nelson 法¹⁹⁾で定量し、FDP は Roe 法²⁰⁾で定量した。

試薬 CMP は協和醗酵工業 K.K., から恵与されたものを使用した。その他のものはすべて市販の試薬特級を用いた。

実験結果及び考察

CMP とコリンから CDP-コリン生成能を有する酵母の検索 標準反応液を用いて、CMP とコリンから CDP-コリンを生成する酵母のスクリーニングを行なった。Table 1, A 欄に示すように、CMP とコリンから比較的多量の CDP-コリンを生成する菌株として、*Candida utilis* IFO 0936, IFO 0639, IFO 1089, *Hansenula beijerinckii* IFO 0981, *H. jadinii* IFO 0987, *H. miso* IFO 0146, *Saccharomyces carlsbergensis* IFO 0641, *S. cerevisiae* IFO 0021, および、*S. rouxii* IFO 0320, IAM 4369 が得られた。これらの酵母の CDP-コリン生成量は 6 時間反応で 4-9 $\mu\text{moles/ml}$ であった。これらの酵母は P-コリンと CMP から比較的多量の CDP-

Table 1. Distribution of choline kinase and CDP-choline forming activity in yeasts.

	Nucleotides found in 6 hr incubation (mM)			
	CDP+CTP	CDP-choline (A)	Choline (B)	Choline kinase*
<i>Brettanomyces claussenii</i> (IFO 0627)	1.64	1.99	4.84	0.5
<i>Candida krusei</i> (IFO 0013)	7.22	2.31	3.66	2
<i>Candida parapsilosis</i> (IFO 0708)	13.00	4.05	5.29	—
<i>Candida pseudotropicalis</i> (IFO 0617)	2.09	1.95	2.43	1
<i>Candida rugosa</i> (IFO 0591)	trace	trace	—	0
<i>Candida tropicalis</i> (IFO 0006)	13.40	1.45	4.45	—
<i>Candida utilis</i> (IFO 0396)	2.40	5.10	5.02	13
<i>Candida utilis</i> (IFO 0639)	2.99	6.39	6.39	15
<i>Candida utilis</i> (IFO 1086)	3.93	4.63	5.50	160
<i>Debaryomyces globosus</i> (IFO 0016)	7.71	0.93	2.60	—
<i>Debaryomyces hansenii</i> (IFO 0023)	14.10	2.95	3.55	—
<i>Debaryomyces subglobosus</i> (IFO 0794)	10.70	4.92	4.50	—
<i>Debaryomyces vini</i> (Y.U.)	18.45	1.93	4.00	0.5
<i>Endomyces hordei</i> (IFO 0104)	1.44	0.58	1.80	0.5
<i>Eremusculus fertilis</i> (IFO 0691)	13.20	2.40	2.46	1
<i>Hanseniaspora valbyensis</i> (IFO 0115)	17.40	3.35	2.02	—
<i>Hansenula anomala</i> (IFO 0149)	2.08	0.81	3.09	—
<i>Hansenula anomala</i> (IFO 0569)	2.03	1.35	1.35	—
<i>Hansenula beijerinckii</i> (IFO 0981)	8.70	5.09	5.95	1
<i>Hansenula bimundalis</i> (IFO 1366)	10.02	2.30	3.00	1
<i>Hansenula jadinii</i> (IFO 0987)	6.75	9.15	9.00	100
<i>Hansenula matritensis</i> (IFO 0954)	17.00	1.83	2.90	—
<i>Hansenula miso</i> (IFO 0146)	1.80	6.50	6.95	—
<i>Hansenula mrakii</i> (IFO 0985)	15.21	2.82	4.05	—
<i>Hansenula octosporus</i> (IFO 0145)	6.60	2.56	4.82	14
<i>Hansenula petterssonii</i> (IFO 1372)	14.78	0.58	1.52	6

	Nucleotides found in 6 hr incubation (mM)			
	CDP+CTP	CDP-choline (A)	Choline (B)	Choline kinase*
<i>Hansenula saturnus</i> (IFO 0117)	19.70	0.87	1.52	10
<i>Hansenula silvicola</i> (IFO 0807)	0.68	0	1.16	—
<i>Hansenula wingei</i> (IFO 0976)	2.96	1.26	2.59	8
<i>Lipomyces lipoferus</i> (IFO 0673)	trace	trace	trace	—
<i>Pichia polymorpha</i> (IFO 0195)	2.80	3.00	3.64	17
<i>Rhodotorula glutinis</i> (IFO 0388)	0	0	—	—
<i>Rhodotorula rubra</i> (IFO 0889)	4.30	1.54	1.93	0.5
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (IFO 0641)	14.40	4.75	4.65	1.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 0021)	4.81	5.20	6.50	—
<i>Saccharomyces rouxii</i> (IFO 0320)	14.40	4.45	5.80	1
<i>Saccharomyces rouxii</i> (IAM 4369)	13.15	6.38	6.93	1
<i>Torulopsis candida</i> (IFO 0768)	18.20	1.83	—	0

* Relative activity of choline kinase was determined by phosphorylation of ethanolamine under the fermentation conditions. Hundred per cent activity corresponds to a phosphorylation of ethanolamine of 3.32 μ moles/ml/hr. (A), no supplementation of *T. candida*; (B), *T. candida* supplemented (100 mg/ml).

コリンを生成するもので、CMP のリン酸化能、および CDP-choline pyrophosphorylase 活性の強いものである。⁸⁾ CMP と P-コリンから CDP-コリンを生成する能力を持ちながら、⁸⁾ コリンと CMP からの CDP-コリン生成能の弱い菌種として、*C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *D. globosus*, *D. vini*, *H. matritensis*, *H. mrakii*, *H. saturnus*, *Torulopsis candida* などが挙げられる。中でも *T. candida* は特に CMP のリン酸化および CDP-choline pyrophosphorylase 活性の強いことが示されているので、⁸⁾ 他の酵母の反応液に両酵素を補充する目的で、*T. candida* の菌体を添加して CDP-コリン生成を検討した。Table 1, B 欄に示すように、*T. candida* を添加して CDP-コリンの生成が促進されたものは *Brettanomyces claussenii*, *C. tropicalis*, *D. vini*, *H. anomala* などであるがその他の酵母では促進効果は認められなかった。この結果から明らかなように、特にコリンキナーゼ活性の高い酵母を見出すことはできなかった。

反応生成物の単離、同定 CDP-コリンの生成量

の最も大きかった *H. jadinii* を用いて反応生成物の単離、同定を行なった。後述の改良した反応液組成で、2 mmole の CMP を用いて 8 時間、28°C で振とう反応し、生成する CDP-コリンを前述の方法で単離し、白色板状の強い吸湿性を示す結晶 120 mg を得た。本結晶の融点は 266–267°C で (269°C で分解)、水溶液の酸性、中性、塩基性条件下での紫外線吸収スペクトルは Fig. 1 に示すようにシチジヌクレオチドのそれと一致した。

本結晶の赤外線吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。

1660 cm^{-1} に pyrimidine 環に存在する $\text{O}=\text{C}-\text{N}^+$,
 N^+
 1220–1240 cm^{-1} に $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, 1080 cm^{-1} に $-\text{P}-\text{O}-$
 $\text{O}=\text{C}$ $\text{O}=\text{C}$ OH
 CH_2 , および 920–940 cm^{-1} に $\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-$ の存在
 OH OH

を示すピークが認められた。同様に Proton Magnetic Resonance (PMR) スペクトルを Fig. 3 に示した。 $\delta=3.19$ に $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ の存在を示すシグナルと 9 個の

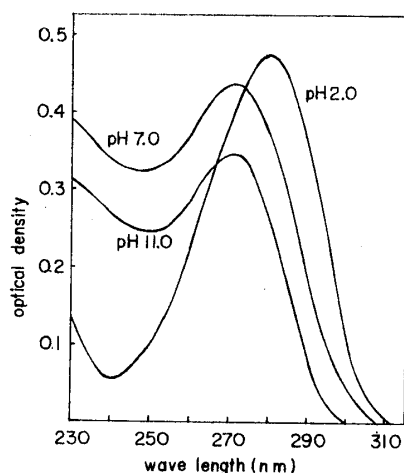


Fig. 1. Ultra violet absorption spectra of the product in the various pH solutions.

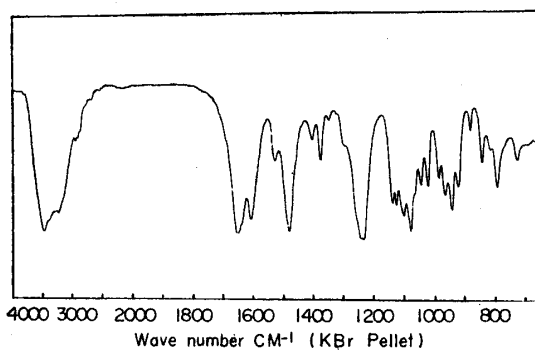


Fig. 2. Infra-red absorption spectrum of CDP-choline Na-salt.

プロトン, $\delta=6.05, 6.14$ に Pyrimidine 環 5 位のプロトン 1 個, $\delta=7.9, 8.0$ に Pyrimidine 環 6 位のプロトン 1 個が認められた. $\delta=5.98$ にはリボースの 1' のプロトン 1 個の存在が認められたことなどから本物質がコリンとシチジンから成るものであることが明らかになった.

元素分析の結果は C=26.22%, H=5.47%, N=9.43% であり $C_{14}H_{26}N_4P_2O_{11} \cdot Na_2 \cdot 6H_2O$ の分子式を推定した. また, 酸性溶液での光学濃度から CDP-コリン 1 モル当り約 6 モルの H_2O を含むことを認めた.

結晶標品の水溶液を 1N-HCl 濃度で 100°C 60 分間加水分解して得られる核酸関連物質は PPC 上では CMP と同じ R_f 値を示した. すなわち, PPC 展開溶剤として (A) 95% エタノール: 1M 酢酸アンモニウム (pH 7.0) (2:1), (B) *iso*-butyric acid: 0.5N NH_4OH (10:6), (C) *iso*-propanol: conc NH_4OH : H_2O (7:1:2) を用いた際の標準 CMP と酸分解によって得られる核酸の R_f 値は (A) で 0.27, (B) で 0.39, (C) で

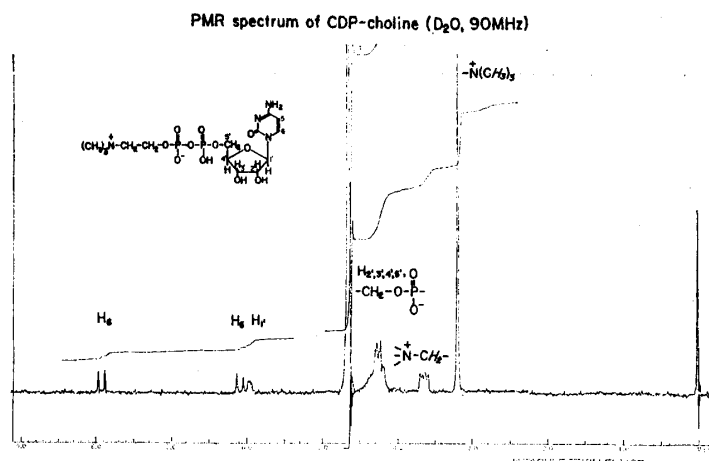


Fig. 3. Proton magnetic resonance spectrum of CDP-choline- Na_2 .

0.08 でよく一致した.

酸加水分解によって P-コリンと同じ R_f 値を有する有機リン酸エステルが得られた. 本物質は酸加水分解後に活性炭処理して核酸を除いたのち, 中和して alkaline phosphatase で処理すると PPC, および TLC 上に標準コリンと同じ R_f 値を有するものであった. PPC の展開剤としては (A) phenol (50g) + *n*-butanol (50 ml) + 80% formic acid (3 ml) + H_2O (10 ml)²¹⁾; (B) 95% エタノール: 1M 酢酸アンモニウム (pH 7.0) (2:1); を使用し, TLC の展開剤として (C), メタノール: conc HCl (95:5)¹⁵⁾ を用いた. コリンの R_f 値は (A) で 0.60, (C) で 0.51, P-コリンの R_f 値は (B) で 0.50 であった.

以上の結果から単離した結晶を CDP-コリンであると同定した.

H. jadinii による CDP-コリン生成条件の検討

1. 反応液組成の至適条件の設定 *H. jadinii* を用いる CDP-コリンの醸酵生産の至適条件を, 標準反応液組成の個々のものについて検討した. Table 2 に示す CDP-コリン生成の好適な反応液組成は以下に述べるようにして得られた. まず, CDP-コリン醸酵において, 使用するリン酸緩衝液の pH の及ぼす影響を検討した. pH を 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.9 と変えた緩衝液を用いた反応液の初発 pH (反応開始 30 分後に反応を停止して測定) はそれぞれ, 5.8, 5.9, 6.4, 6.5, 7.1, 7.4 であった.

コリンを使用する CDP-コリン醸酵の至適初発 pH は 6.5~7.4 であった. 初発 pH が 6.4 での CDP-コリン生成量は初発 pH 6.5 の反応液の約 50% であり, 5.9, 5.8 ではほとんど CDP-コリンの生成は認められな

Table 2. Composition of reaction mixture suitable for CDP-choline formation.

5'-CMP	20 μ moles/ml
Choline chloride	80 μ moles/ml
Glucose	600 μ moles/ml
Potassium phosphate buffer (pH 8.0)	300 μ moles/ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 μ moles/ml
Cells	100 mg/ml
Total	2.0 ml

った。対照として P-コリンを用いた系では初発 pH 6.4-7.4 の範囲で高い活性を示したが、pH 5.9 前後ではコリンを用いた系と同様に生成はほとんど認められなかった。この CDP-コリン生成量の低下の原因は CMP のリン酸化の阻害によるものではない。すなわち、初発 pH が 5.8 であっても、CMP のリン酸化は反応開始 2 時間でほぼ完了することを認めた。これはまた、リン酸化のためのエネルギー供給が低い pH でも正常に行なわれていることを示すものである。これらの結果から CDP-コリンピロフォスホリラーゼとコリンキナーゼは共に酸性側 pH で活性が低下するが、特に後者の方が強く影響を受けることが明らかにされた。これはコリンキナーゼの特性で、ビール酵母^{21, 22)} や rapeseed²³⁾ のコリンキナーゼの性質と良く似ている。なお、本菌からコリンキナーゼを部分精製して同様の現象を確認した(柄倉, 相坂, 荻谷, 木村: 昭和 49 年農化関西支部例会講演)が、その詳細については次報以下で報告する予定である。

CDP-コリン 醗酵におけるリン酸緩衝液の最適濃度は 300 mM 前後であった。リン酸濃度が 300 mM よりも低いと CMP のリン酸化される総量も少なく CDP-コリンの生成量も低かった。一方、400-600 mM の濃度では CMP は 100% リン酸化されたにもかかわらず CDP-コリンの生成量は低下した。リン酸濃度が 800 mM では、CMP のリン酸化は起らず CDP-コリンの生成も認められなかった。この結果、本菌の高濃度無機リン酸存在下での醗酵能はパン酵母のそれ²⁴⁾ に比べて弱いことが示唆された。

CMP やコリンのリン酸化エネルギーの供給体としてのグルコースの最適濃度は 600 mM 前後であった。反応を 6 時間行なったとき、グルコース濃度が 600~1,200 mM では CDP-コリンの収量は 10~12 μ moles/ml でほぼ等しかったが、400 mM 以下の濃度では CDP-コリンの生成量は低く、かつ一度生成した CDP-

コリンの分解が認められた。

Mg²⁺ はコリンキナーゼ,²²⁻²⁴⁾ 解糖系,²⁵⁻²⁷⁾ および糖スクレオチド醗酵^{12, 13)} において必須の因子であることが知られている。CDP-コリンの醗酵生産は 10~30 mM の Mg²⁺ の添加で著しく促進された。30 mM 以上の濃度では生成量は一定であった。20 mM の CMP に対し 4~5 倍量に相当する 80~100 mM のコリンを使用する時 CDP-コリンの最大生成値が得られ、6 時間反応で 12~13 μ moles/ml の CDP-コリンが生成した。コリンの濃度が 40 mM 以下の低濃度では生成量は低かった。200 mM のコリンを用いても CDP-コリン生成は阻害されなかった。

CMP の CDP-コリンへの転換率は CMP 濃度の低い時に高く、濃度を高めると転換率は低下した。すなわち、CMP 濃度を 5, 12, 20, 30, 40, 50 (mM) としたとき、6 時間の反応によって得られる CDP-コリン量はそれぞれ 4~4.5, 6.5~7.5, 11~13, 10~12, 9~10, 8~9 (μ moles/ml) で転換率は 80~90, 55~65, 55~65,

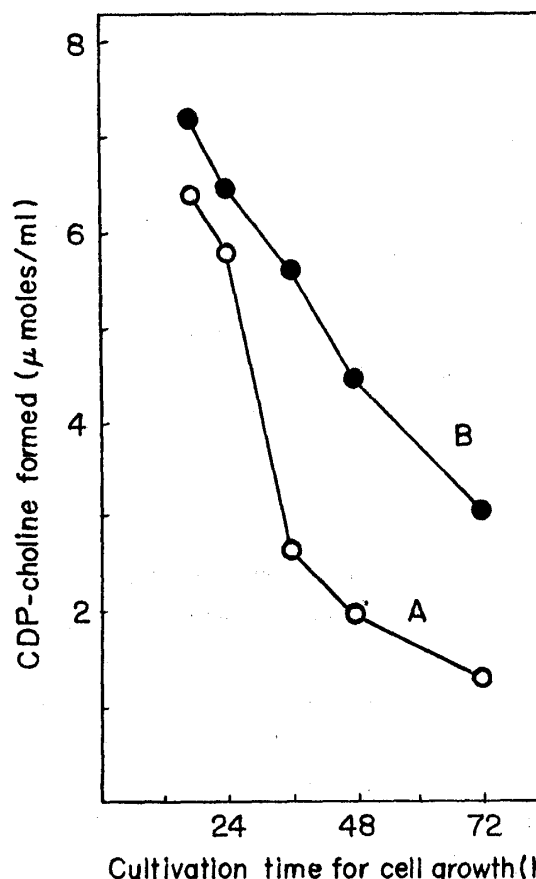


Fig. 4. Effect of cultivation time of cells on CDP-choline fermentation.

Reaction mixture was the same as shown in Table 2. Reaction was carried out for 2 hr (A), and 4 hr (B).

30~40, 22~25, 15~18(%)であった。

2. 培養時間と CDP-コリン生成能の関係 CDP-コリンの生成量は供試乾燥菌標品によってしばしば変動した。この原因が菌の培養時間と密接な関係を有することが培養時間を変えて調製した乾燥菌体を用いた結果示された。Figure 4 に示すように CDP-コリン生成能は培養時間の増加にともなって低下した。CDP-コリン生成能の低下の原因を明らかにする目的で、生成能の大きい18時間培養菌体と、極端に生成能の低下している72時間培養菌体を用いて両反応系における生成物の変化について検討した。

Figure 5 に示すように、両標品における CMP のリン酸化はほぼ等しい。その結果 CMP をリン酸化する酵素系とエネルギー供給系には両標品間に差のないことが示され、同時に長時間の培養によってコリンキナーゼか CDP-コリンピロフォスホリラーゼのいずれかの酵素活性が低下する可能性が示された。

P-コリンを用いても CDP-コリン生成は培養時間の長い菌体では低くコリンを用いる時とほぼ同程度であった。これは長時間培養によって CDP-コリンピロフォスホリラーゼ活性が低下したことを示すものである。また、CMP を含まない反応液組成を用いて醗酵条件下に蓄積するP-コリン量からコリンキナーゼ活性を比較した結果を得た。すなわち、18時間培養の菌体のコリンキナーゼ活性を100(27 μ moles P-コリン生成量/100 mg 菌体/6 hr, 28°C) とすると、24, 36, 48, 72 時間培養の菌体の性活はそれぞれ96, 78, 56, 44であった。

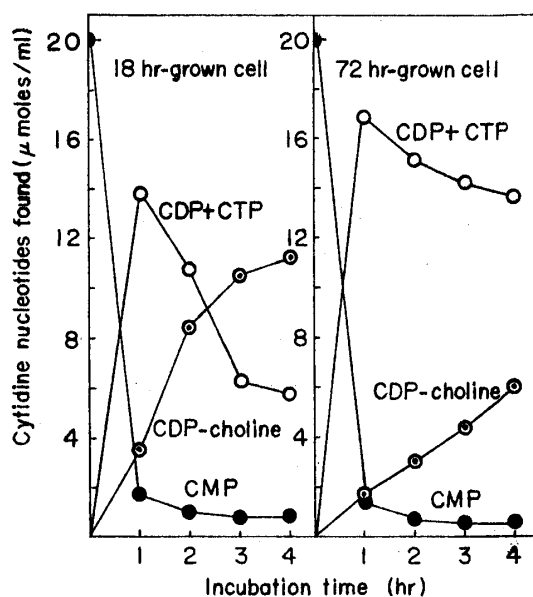


Fig. 5. Differences in chemical changes of CDP-choline fermentation between 18 hr- and 72 hr-grown cell systems. Reaction mixture was the same as shown in Table 2.

培養時間を延長すると菌体収量は増加するが、CDP-コリン生成に関与する酵素活性が低下するので高い生成活性を有する乾燥菌体標品を得るには培養時間を18時間前後に設定することが好ましい。

3. CDP-コリン醗酵における菌体濃度の影響

18時間培養した菌体の乾燥標品を用いて 20 mM の CMP を含む反応系で CDP-コリン生成反応に対する菌体濃度の効果を検討した。Figure 6 に示すように菌

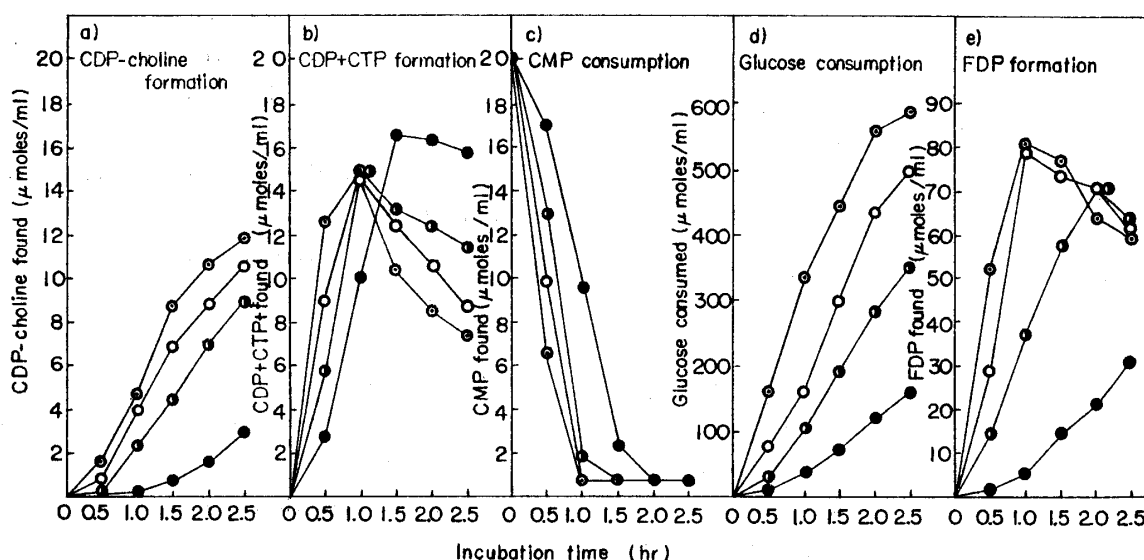


Fig. 6. Effect of cell concentration on chemical changes in CDP-choline fermentation. Composition of the reaction mixture was the same as shown in Table 2. The cell (18 hr cultured) concentration was varied as indicated below:
●—●, 50 mg/ml; ○—○, 100 mg/ml; ○—○, 150 mg/ml; ○—○, 200 mg/ml.

体量が 100 mg/ml 以上において反応時間の経過とともに CDP-コリンの著しい生成が起った。菌体 200 mg/ml を用い、2.5 時間反応で約 12 μ moles/ml の CDP-コリンが生成したが、菌体 50 mg/ml の低濃度では CDP-コリンの生成量は極端に低かった (約 3 μ moles/ml)。グルコース消費の面から反応経過をみると、菌体 100 mg/ml 以上では 1 時間反応で 100~350 μ moles/ml のグルコースが消費され、リン酸化のエネルギー源として利用され得る FDP も 35~80 μ moles/ml 蓄積した。このような FDP の著しい蓄積が起る反応 1 時間で CMP はほぼ完全にリン酸化され、以後 CDP+CTP の減少につれて CDP-コリンの生成量が増大した。

菌体 50 mg/ml 濃度ではグルコースの消費と FDP の蓄積はゆるやかに進行し、CMP のリン酸化に遅れが観察されたが、1.5 時間反応で CDP+CTP が約 17 μ moles/ml 生成した。しかし CMP のリン酸化量に比較して CDP-コリンの生成は微量であった。これらの結果から CDP-コリンを効率よく生成せしめるには 100 mg/ml 以上の菌体を添加することが好ましい。

要 約

1. コリンと CMP から CDP-コリンを高濃度に醸酵生産する酵母を乾燥菌体を用いてスクリーニングした結果、*H. jadinii* IFO 0987 を得た。この他に *C. utilis* IFO 0396, IFO 0639, IFO 1086, *H. beijerinckii* IFO 0981, *H. miso* IFO 0146, *S. carlsbergensis* IFO 0641, *S. cerevisiae* IFO 0021, *S. rouxii* IFO 0320 および IAM 4369 などが相当量の CDP-コリンを生産する菌株として得られた。

2. コリンと CMP から、醸酵条件下に生成するシチジンスクレオチドをイオン交換クロマトグラフィーにより単離し、化学的、物理化学的分析を行なって CDP-コリンであると同定した。

3. *H. jadinii* IFO 0987 による CDP-コリンの醸酵生産は、反応液の pH によって左右される。また、培養時間の延長によつてもコリンキナーゼ、CDP-コリンピロホスホラーゼの両酵素活性の低下が認められた。

4. *H. jadinii* IFO 0987 による醸酵条件下での CDP-コリン生成条件を検討し、次の反応液組成を好適条件として選んだ。CMP, 20; choline, 80; Glucose, 600; Potassium phosphate buffer (pH 8.0), 300; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 (μ moles/ml)。

200 mg/ml の乾燥菌体を用いて 6 時間反応を行ない、約 13 μ moles/ml の CDP-コリン (対 CMP 収率とし

て 65%) を得た。

おわりにのぞみ、PMR スペクトルの解析をお願いした京都大学農学部食品工学科、小清水弘一助教授、IR スペクトルの解析をお願いした京都大学工学部石油化学教室、杉田利夫助教授、ならびに元素分析をお願いした京都大学化学研究所元素分析室、平澤豊代氏に深謝致します。

文 献

- 1) Borkenhagen, L. F., Kennedy, E. P.: *J. Biol. Chem.*, **227**, 951 (1957).
- 2) Weiss, S. B., Smith, S. W., Kennedy, E. P.: *J. Biol. Chem.*, **231**, 53 (1958).
- 3) Kennedy, E. P.: *J. Biol. Chem.*, **222**, 185 (1957).
- 4) Ansell, G. B., Chojnacki, T.: *Biochem. J.* **98**, 303 (1966).
- 5) 田中, 田中, 齊藤, 石田: 薬学誌 **85**, 863 (1965).
- 6) 宮内, 内田, 吉野: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **25**, 47 (1972).
- 7) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Tachiki, T., Gotan, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 763 (1970).
- 8) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Tachiki, T., Gotan, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 769 (1970).
- 9) Kimura, A., Morita, M., Tochikura, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1955 (1971).
- 10) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Gotan, T.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 1005 (1971).
- 11) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Gotan, T.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 178 (1972).
- 12) Tochikura, T., Kawai, H., Tobe, S., Kawaguchi, K., Osugi, M., Ogata, K.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 957 (1968).
- 13) Tochikura, T., Kawai, H., Gotan, T.: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 564 (1969).
- 14) Tochikura, T., Kawai, H., Gotan, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 163, 1578 (1971).
- 15) Reissmann, W., Wieske, T. H.: *Anal. Biochem.*, **19**, 46 (1967).
- 16) Hanes, C. S., Isherwood, F. A.: *Nature*, **164**, 1107 (1949).
- 17) Malamy, M. H., Horecker, B. L.: *Biochem.*, **3**, 1893 (1964).
- 18) Fiske, C. H., SubbaRow, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 19) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).

- 20) Roe, J. H., Papadopoulos, N. M.: *J. Biol. Chem.*, **210**, 703 (1954).
- 21) Bremer, J., Figaro, P. H., Greenberg, D. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 477 (1960).
- 22) Wittenberg, J., Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.*, **202**, 431 (1953).
- 23) Ramasarma, T., Wetter, L. R.: *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **35**, 853 (1957).
- 24) Brostrom, M. A., Browning, E. T.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2364 (1973).
- 25) 梶倉, 桑原, 八木, 岡本, 富永, 加野, 緒方: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **18**, 93 (1968).
- 26) Robins, E. A., Doyer, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 121 (1957).
- 27) Berger, L., Slein, M. W., Colowick, S. P., Cori, C. F.: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 379 (1946).