発酵法による核酸関連物質の生産 (第 10 報)*

微生物のピリミジン要求変異株によるオロチジン
およびオロチン酸の蓄積

中山 清, 佐藤善六, 田中晴雄, 木下祝郎 (協和発酵工業株式会社東京研究所)

昭和 39 年 10 月 24 日 受 理

緒 言

微生物のピリミジン要求変異株によるオロチン酸の蓄積はかなりの微生物について報告されており⁽¹⁻⁶⁾, 特に田中ら⁽⁴⁾はグルタミン酸生産菌 *Micrococcus glutamicus* のウラシル要求株を用い, 対糖 20% のオロチン酸を培養液中に蓄積せしめることに成功している。オロチン酸のリポンドであるオロチジンの蓄積は 1951 年 Michelson ら⁽⁶⁾により *Neurospora* のピリミジン要求株が菌体内に微量蓄積することが報告されたのが最初である。最近小西ら⁽⁷⁾は *Bacillus subtilis* のウラシル要求株が数 mg のオロチジンを培養液中に蓄積することを報告した。

われわれは種々の微生物の栄養要求変異株の蓄積物について検討中, *B. subtilis* の他に *Micrococcus glutamicus*, *Corynebacterium rathayi*, *Brevibacterium ammoniagenes* のピリミジン要求変異株が培養液中にオロチジンとオロチン酸を蓄積することを見いだした。本報ではこれらの微生物によるオロチジン, オロチン酸生成の確認とこれらの物質の蓄積におよぼす培地組成の影響について報告する。

実験方法

使用菌株 : 当研究所において変異処理により誘導された⁽⁸⁻⁹⁾ 栄養要求株である。それらは第 1 表に示した如く *Micrococcus glutamicus* の 2 株 (No. 9824, No. 9814), *Corynebacterium rathayi* No. 7733, *Bacillus subtilis* No. 7590 および *Escherichia coli* No. 8252 である。

培養法 : 種培養はグルコース 2%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 食塩 0.25% (pH 7.2) の組成の培地に 24 時間培養した。この種培養を発酵培地に 10% の率で植菌した。培養は種培地は 30 ml, 発酵培地は 20 ml を 250 ml の三角フラスコに分注殺菌後, 30° で回転型振盪機 (200 r. p. m., 振幅 5 cm) で振盪培養した。

ペーパークロマトグラフィー : 東洋濾紙 No. 51 A を用い, 28° で上昇法で展開した。使用した溶媒系は (A) ブタノール-エタノール-ギ酸-水 (5:3:2:1)⁽⁸⁾, (B) イソ酪酸-酢酸-1 N NH₄OH (10:1:5) である。

カラムクロマトグラフィー : *M. glutamicus* 9824 の培養濾液 (酵母エキス 2% で培養したものと, 酵母エキス 0.25% で培養したものを合併使用) 35 ml に炭末 (白サギ特選) 0.5 g を加えて pH 5 で 30 分吸着させ, 炭末から 1% アンモニア含有 50% エタノールで溶出し, 溶出液を減圧濃縮してアンモニアを除去した液 2 ml を Dowex 1×-2 (Cl 型) カラム (10 ml, 高さ 13.5 cm) にかき, 蒸留水, 0.01 N HCl, 0.05 N HCl, 0.1 N HCl, 0.5 N HCl を用いて段階溶出を行った。この操作には “UVICORD” (LKB-Produkter Fobriksaktibolag, Stockholm 製) を用い, 溶出液は 3 ml ずつ分取し, 分析した。

分析法 : オロチン酸, オロチジンの定量とも培養液の遠沈上澄液の一定量を濾紙にスポットして, 上記溶媒 (A) を用いてクロマトグラフィーを行ってから, それぞれのスポットを切りとり 4 ml の水で 100° で 1 時間抽出後, 抽出液の吸光度から計算した。オロチン酸の吸光度は 280 mμ で測定し, $\epsilon \times 10^{-3} = 7.68$ (pH 4.4~7.2)⁽¹⁰⁾ を用い, オロチジンの吸光度は 267 mμ で測定し $\epsilon \times 10^{-3} = 9.57$ (0.1 N HCl)^(6,11) を用いて計算した。オロチン酸, オロチジンは水に対する溶解度が低いいため, 培養液中で不溶で沈殿している場合がある。沈殿している量の定量

* Production of Nucleic Acid Related Substances by Fermentative Processes. Part X. Accumulation of Orotidine and Orotic Acid by Pyrimidine-Auxotrophic Mutant of Microorganisms. By Kiyoshi NAKAYAMA, Zenroku SATO, Haruo TANAKA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)

は次のように行った。培養液 10 ml の遠沈上澄について溶解しているものを定量し、遠沈沈殿 (炭酸カルシウム、菌体と沈殿したオロチン酸、オロチジンを含む) を 5 ml の水にサスペンドして稀 NH_4OH (1:1) 5 滴を加え、かくはんして 10 ml として沸騰湯浴中で 3 分間加熱して冷えぬうちに遠心分離して、その上澄液について上記した如くペーパークロマトグラフィーを行って分析した。表および図中の分析値はいずれも培養 96 時間の値を示した。

紫外外部吸収曲線は日立 EPS 自記分光光度計を使用して記録した。菌の生育度は発酵液を遠沈して、沈殿を蒸溜水にサスペンド後炭酸カルシウムを 2 N HCl でとかしてから稀釈して、培養液に対する稀釈率 21 倍で 650 m μ における吸光度を Beckman DU 型分光光度計で測定して、その吸光度であらわした。

実験結果

1. オロチジンおよびオロチン酸生成の確認

栄養要求変異株の生産する紫外外部吸収物質を検索中、第 1 表に示した諸菌株が溶媒系 (B) を用いたペーパークロマトグラフィーにおいて R_F 0.33 と R_F 0.27 に吸収スポットを示した。 R_F 0.33 のスポットは標準オロチン酸とその R_F 値およびスポットの水抽出液の紫外外部吸収曲線の特徴が一致した。 R_F 0.27 のスポットはオロチジンの吸収特徴を示した。溶媒系 (B) は両スポットが接近しているの、両者を完全に分離できる溶媒系を探

した結果、溶媒系 (A) が適当なことを見いだした。この溶媒系ではオロチン酸の R_F は 0.34~0.38 で (文献⁽³⁾では下降法で 0.42)、オロチジン様のスポットの R_F は 0.18~0.20 であった。各々のスポットの紫外外部吸収曲線は第 1 図に示した如くで、それぞれオロチン酸および文献^(5,6,10,11) 記載のオロチジンの吸収曲線と一致していた。

以上から培養液中の蓄積物質はオロチン酸およびオロチジンと考えられるが、さらにアニオン交換樹脂 Dowex-1 $\times$ 2 (Cl^- 型) を用いるカラムクロマトグラフィーにより確認した。すなわち *M. glutamicus* No. 9824 の培養濾液を実験法の項に述べた如く炭末吸着溶出処理をしたものを Dowex-1 のカラムにかけ塩酸系による段階的

第 1 図 ペーパークロマトグラムのオロチン酸、オロチジンのスポットの抽出液の紫外外部吸収曲線

第 2 図 カラムクロマトグラム
0.05 N HCl の前に蒸溜水で 2 時間、0.01 N HCl で 1 時間溶出。
流速 17 ml/時間、その他の条件は本文に記した。

溶出を行った。溶出パターンは第 2 図に示した如くである。オロチン酸とオロチジンの分離は不完全であったが 2 つのピークとし溶出され、オロチン酸、オロチジン各単独の溶出区分の吸収曲線、ペーパークロマトグラフィ、リボースの分析、燐酸の定性反応から、それぞれがオロチン酸、オロチジンなることを確認した。オロチン酸区分はリボース反応陰性であり、オロチジンの区分はオロチン酸対リボースの比がほぼ 1:1 であり、燐酸は陰性であった。塩酸オルシノール反応でリボースの呈色が表示されることもオロチジンに特異的である⁽¹⁾。

2. 各種菌体によるオロチジンおよびオロチン酸の生成

第 1 表に各種細菌のピリミジン要求株のオロチジンお

第 1 表 種々の細菌のピリミジン要求変異株による
オロチン酸、オロチジンの蓄積

微生物	栄養要求	培地中の 酵母エキ ス濃度 (%)	蓄積物(mg/ml)	
			オロチ ジン	オロチ ン酸
<i>M. glutamicus</i> 9824	ad, u	2	1.55	0.60
<i>M. glutamicus</i> 9814	ad, pyr	2	0.15	0.40
<i>C. rathayi</i> 7733	u	0.5	0.16	0.12
<i>Brev. ammoniagenes</i> 7349	u	2	1.08	0.87
<i>B. subtilis</i> 7590	u	1	0.43	0.62
<i>E. coli</i> 8252	アミノ酸	1	—	0.48

基礎培地: ブドウ糖 1%, NH_4Cl 0.7%, K_2HPO_4 0.6%, KH_2PO_4 0.6%,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6%, CaCO_3 3%, 酵母エキス表示, pH 7.2
培養時間: 96 時間。

第 3 図 *M. glutamicus* 9824 のオロチン酸、オロチジン蓄積におよぼす燐酸カリ、マグネシウム塩濃度の影響

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

よびオロチン酸蓄積の例を示した。*M. glutamicus* No. 9824 (ad, u), *M. glutamicus* No. 9814 (ad, pyr), *C. rathayi* No. 7733 (u), *Brev. ammoniagenes* No. 7349 (u), *B. subtilis* No. 7590 (u) はいずれもオロチジンとオロチン酸の両方を蓄積した。*E. coli* No. 8252 はアミノ酸要求株であるがオロチン酸を蓄積した。

3. *M. glutamicus* No. 9824 の培養条件

M. glutamicus No. 9824 のオロチジン、オロチン酸蓄積におよぼす培地組成の影響を検討した。第 1 表に示した基礎培地組成中、燐酸水素二カリウム、燐酸二水素カリウム、硫酸マグネシウムの濃度を検討した。三者の濃度を同じ準位に変化した場合の結果は第 3 図に示した如くである。三者の濃度が低い方がオロチン酸の蓄積は

よかった。オロチジンの蓄積は三者の濃度変化により著しい差はなかったが、低い場合の方が若干蓄積量が大であった。硫酸マグネシウムの濃度を 0.4 および 0.1% として燐酸塩の濃度を変えた場合の結果も同様の傾向であった。硫酸マグネシウムの濃度が 0.1% の場合の結果は第 4 図に示した。三者の濃度はいずれも 0.1~0.2% が適当と考えられる。

酵母エキスの濃度の影響は燐酸塩、硫酸マグネシウムが 0.2%, 0.1% のいずれの場合も同様であった。三者の濃度を 0.2% とした場合の結果は第 5 図に示した如くである。オロチン酸

第 4 図 *M. glutamicus* 9824 のオロチン酸、オロチジン蓄積に及ぼす燐酸カリ濃度の影響 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% の場合)

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

の蓄積は 2% で最も多かったが、オロチジンの蓄積は 4%の方がさらに大であった。

オロチン酸、オロチジンの生成は培養時間 3~6 日の

第 5 図 *M. glutamicus* 9824 のオロチン酸、オロチジン蓄積におよぼす酵母エキス濃度の影響 (磷酸塩, 硫酸マグネシウム各 0.8%)

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

第 6 図 *M. glutamicus* 9824 のオロチン酸、オロチジン蓄積におよぼすウラシル濃度の影響

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

範囲で著しい差はなかった。ただオロチジンの蓄積は培養時間が長い方が若干蓄積量が大であった。ピリミジンの前駆物質であるアスパラギン酸の添加は顕著な効果を示さなかった。塩化アンモニの代りに尿素を窒素源として培養中間期的に pH を中性とした場合、オロチン酸の生成量は 6.1 mg/ml に達したが、オロチジンの生成量は 1.5 mg/ml であった。オロチジンの生成は塩化アンモニ使用培地の方がむしろよく、酵母エキス 2% でグルコースを別殺菌した場合 2.6 mg/ml 蓄積した。

磷酸塩, 硫酸マグネシウムの濃度各 0.1% で酵母エキスの代りにビオチン 30 μg/l とウラシル, アデニンをを用いた合成培地を検討した。アデニン 200 μg/ml でウラシルの濃度を変化した場合の結果は第 6 図に示した。菌の生育はウラシル濃度の増加と共に増大したが、オロチン酸, オロチジンの蓄積はウラシルの濃度がそれぞれ 50 μg/ml, 100 μg/ml で最大であり, ウラシル 200 μg/ml では蓄積は著しく低かった。一方アデニンの濃度は多い方が生育, オロチン酸, オロチジンの蓄積とも大であった。

4. *Brev. ammoniagenes* No. 7349 の培養条件

Brev. ammoniagenes No. 7349 のオロチン酸, オロチジンの蓄積は磷酸塩の濃度が高い (0.8%) 方が低い場合より蓄積大であった。この点 *M. glutamicus* No. 9824

第 7 図 *Brev. ammoniagenes* 7349 のオロチン酸、オロチジン蓄積におよぼす酵母エキス濃度の影響

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

第8図 *Brev. ammoniagenes* 7349 のオロチン酸, オロチジン蓄積におよぼすウラシル濃度の影響

●—● オロチン酸 ○……○ 生育
▲—▲ オロチジン

の場合と異っていた。

酵母エキスの影響は第7図に示した如くである。オロチン酸, オロチジンの生成とも酵母エキスの濃度が高い(4%)場合によかった。この点も *M. glutamicus* No. 9824 の場合と異った様相である。しかし酵母エキスの代わりにビオチン 30 μg/l とウラシル, アデニンをを用いた合成培地(磷酸塩, 硫酸マグネシウム各 0.1%)では, ウラシル, アデニンの影響は *M. glutamicus* No. 9824 の場合と同様であった。アデニン 200 μg/ml の場合にウラシルの濃度を変化した場合の結果は第8図に示した如くであった。オロチン酸, オロチジンの蓄積ともウラシル 50 μg/ml の場合に最大で, 200 μg/ml のウラシル濃度では蓄積は著しく低く, 特にオロチン酸の蓄積は痕跡であった。

要 約

Micrococcus glutamicus, *Corynebacterium rathayi*,

Brevibacterium ammoniagenes, *Bacillus subtilis* のピリミジン要求株がオロチン酸とオロチジンを培養液中に蓄積することを示した。*Escherichia coli* のアミノ酸要求株はオロチン酸のみを蓄積した。

M. glutamicus No. 9824 のオロチン酸蓄積は酵母エキスの濃度が2%の時最大で, オロチジンの蓄積は4%の方が大であった。*Brev. ammoniagenes* のオロチン酸, オロチジンの蓄積は酵母エキスの濃度が高い(4%)場合が最大であった。

M. glutamicus No. 9824 は尿素を窒素源として培養中, pH を間接的に中性に調整した場合オロチン酸を 6 mg/ml 蓄積し, NH_4Cl を窒素源とした場合オロチジンを 2.6 mg/ml 蓄積した。

合成培地におけるオロチン酸, オロチジンの蓄積は, *M. glutamicus* No. 9824, *Brev. ammoniagenes* No. 7349 のいずれの場合もウラシル 50~100 μg/ml で最大で, 200 μg/ml では著しく低かった。

- (1) H. K. Mitchell, M. B. Houlahan, J. F. Nyc : *J. Biol. Chem.*, **172**, 525 (1948).
- (2) M. S. Brook, D. Ushiba, B. Magasanik : *J. Bacteriol.*, **68**, 534 (1954).
- (3) R. A. Yates, A. B. Pardee : *J. Biol. Chem.*, **221**, 743 (1956).
- (4) 田中勝宣, 中嶋由美, 木下祝郎 : 農芸化学学会大会講演 (昭 36 年 4 月 1 日, 福岡).
- (5) W. L. Belser : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **4**, 56 (1961).
- (6) M. Michelson, W. Drell, H. K. Mitchell : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **37**, 396 (1951).
- (7) 小西真八, 城 照雄, 高橋雅弘 : 農芸化学学会大会講演 (昭 38 年 4 月 4 日, 東京).
- (8) K. Nakayama, S. Kitada, Z. Satō, S. Kinoshita : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 41 (1961).
- (9) 宇田川清, 阿部重雄, 木下祝郎 : 農芸化学学会大会講演 (昭 37 年 4 月 29 日).
- (10) D. Shugar, J. J. Fox : *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 199 (1952).
- (11) J. G. Moffatt : *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1118 (1963).