Brevibacterium ammoniagenes の変異株による

シトシンの蓄積

小林節子*, 荒木和美, 中山 清

(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 52 年 10 月 18 日 受理

Cytosine-producing Mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*

Setsuko KOBAYASHI*, Kazumi ARAKI and Kiyoshi NAKAYAMA

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Machida-shi, Tokyo

During strain improvement of urocanic acid-producing *Brevibacterium ammoniagenes* mutants, some of 2-fluoroadenine-resistant derivatives were found to accumulate a large amount of cytosine in the culture medium. The concentration of cytosine accumulated reached 2.3 mg/ml with a medium containing 11.25% cane molasses (as sugar concentration) and 3.75% glucose. Adenine was also accumulated at the level lower than 1.5 mg/ml. (Received October 18, 1977)

* nee Shimojo.

緒 言

シトシン系物質が他の核酸成分あるいは関連物質とともに微生物培養液中に分泌するという報告⁽¹⁻³⁾があるが、この場合は核酸の分解による生成の可能性が強い。

シトシンの直接発酵による著量蓄積の報告はみあたらず、ただ発酵法によるシチジン⁽⁴⁾、5'-シチジル酸⁽⁵⁾の製法が特許出願されているに過ぎない。

われわれは先に、ウロカニン酸発酵について報告した⁽⁶⁾が、その研究の途上で、*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 を親株として得た、2-fluoroadenine に耐性となったウロカニン酸生産菌株の中に、シトシンを蓄積する菌株を見出したのでここに報告する。

実 験 方 法

1. 試験菌株 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 (野生株) からウロカニン酸生産菌として誘導した各種変異株⁽⁶⁾を使用した。

2. 培地・培養方法 実験に用いた培地の組成は次のとおりである。i) 菌株保存用スラント培地: 肉エキス 1%, ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, 食塩

0.25%, ビオチン 30 $\mu\text{g/l}$ (pH 7.2). ii) 生産試験用種培地: グルコース 4%, 肉エキス 1%, ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, 食塩 0.25%, ビオチン 30 $\mu\text{g/l}$, 尿素 0.3% (pH 7.2). iii) 生産試験培地: 糖類 (グルコースおよび/またはインペルターゼ処理をした甘蔗廃糖蜜⁽⁶⁾) 15% (糖濃度換算), 無機窒素化合物 0~4%, 尿素 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, チアミン $\cdot \text{HCl}$ 2.5 mg/l, ビオチン 200 $\mu\text{g/l}$, β -アラニン 100 mg/l, *d*-パントテン酸カルシウム 10 mg/l, *L*-システイン $\cdot \text{HCl}$ 20 mg/l, CaCO_3 3%, 天然栄養物 0~2%.

生産試験方法は先報⁽⁶⁾に準じ、バッフル板付きの 30 ml 容三角フラスコに培地 20 ml を分注し、植菌後 220 rpm の回転数で 30°C の温度条件下で 5 日間培養した。

3. シトシンおよびアデニンの定量方法 培養液 5~10 μl を東洋濾紙 No. 51 A にスポットして、*n*-ブタノール: 酢酸: 水 (5:2:2) の溶媒系で上昇法により展開し、風乾後、シトシンあるいはアデニンに相当する紫外線吸収スポットを切り取り、これに 8 ml の水を加えて、15 分間加熱抽出し、冷却後シトシンは 274 nm, アデニンは 260 nm の吸光度で測定した。定量値は、シ

* 旧姓, 下条。

トシンあるいはアデニンの標準曲線から算出した。

4. その他 各種薬剤耐性株の分離は先報⁽⁶⁾と同様の方法でおこなった。

5. 試薬 2-fluoroadenine は Montgomery ら⁽⁷⁾の方法により, 当研究所で合成された。その他の試薬は市販品を使用した。

実験結果

1. シトシンの蓄積

先に, 著者ら⁽⁶⁾は, *B. ammoniagenes* ATCC 6872 (野生株) を親株として, ウロカナーゼ欠失性, ヒスチジンアナログ耐性, プリンアナログ耐性, ストレプトマイシン耐性らの性質を順次付与した変異株が, 糖質から直接ウロカニン酸を生成蓄積することを報告した。

これらの変異株の誘導の過程で得たウロカニン酸生産菌 KCYT 95 を, 甘蔗廃糖蜜を含んだ糖 15% (糖濃度換算) 培地で培養している過程で, あらたに培養液中に未知の紫外線吸収物質が蓄積することを認めた。この物質のペーパークロマトグラフィーでの *Rf* 値は, Table I に示すように標準シトシンの *Rf* 値と一致した。また Table I で用いた溶媒系 B と C, および G と H を使用する二次元ペーパークロマトグラフィーの *Rf* 値も標準シトシンの *Rf* 値と一致した。

さらに, 紫外線吸収曲線も Fig. 1 に示すように, 標準

シトシンの曲線ときわめてよく一致した。

以上の結果から, 上記の KCYT 95 の蓄積する未知物質をシトシンと同定した。

2. シトシン生産菌

シトシン生産菌 KCYT 95 は上述のようにして, ウロカニン酸生産菌の改良の過程で偶然選択されたが, 本菌の誘導の過程では Fig. 2 に示すように, ウロカナーゼ欠失性, ヒスチジンアナログ耐性, プリンアナログ耐性の付与らの変異の段階があり, そのうちのどの変異の段階でシトシン生産性が付与されたかは興味ある問題であった。

Fig. 1. UV-absorption Curve of the Substance Produced by *B. ammoniagenes* KCYT 95.

----- pH 2.4, — pH 7.4, — · — pH 11.1.

Table I. Paperchromatographic Identification of Cytosine Produced by *B. ammoniagenes* KCYT 95

Solvent system ^{a)}	<i>Rf</i> -value	
	Sample	Authentic cytosine
A	0.78	0.79
B	0.43	0.47
C	0.54	0.53
D	0.55	0.54
E	0.80	0.81
F	0.64	0.65
G	0.48	0.50
H	0.49	0.48

^{a)} Solvent systems

A : isobutyric acid : 1 N NaOH=3 : 1, B : *n*-butanol : acetone : H₂O : diethylamine=10 : 10 : 5 : 2, C : *n*-propanol : 0.2 N NH₄OH=3 : 1, D : *n*-butanol : acetic acid : H₂O=5 : 2 : 2, E : isobutyric acid : acetic acid : 1 N NH₄OH=10 : 1 : 5, F : isobutyric acid : 0.5 N NH₄OH=10 : 6, G : methanol : ethanol : 12 N HCl : H₂O=50 : 25 : 6 : 19, H : methanol : 12 N HCl : H₂O=70 : 20 : 10.

B. ammoniagenes ATCC 6872 (wild)

Fig. 2. Genealogy of Cytosine-producing Mutants. Abbreviations : TA, 2-thiazo-DL-alanine ; AMT, 3-amino-1, 2, 4-triazole ; TRA, DL-1, 2, 4-triazole-3-alanine ; FA, 2-fluoroadenine. Numbers in parenthesis refer to the amount of cytosine produced by each mutant in the culture medium containing 3.75% glucose, 11.25% (as sugar concentration) molasses, 4% (NH₄)₂SO₄ and 1% meat extract.

そこで KCYT 95 へ至る変異の親株について, そのシトシン生産性を調べた結果は, Fig. 2 に示すように, UTAR 8 (ウロカナーゼ欠失性, 2-thiazo-DL-alanine 耐性, 3-amino-1,2,4-triazole 耐性, DL-1,2,4-triazole-3-alanine 耐性株) に 2-fluoroadenine 耐性を付与して得た KCY 64 でもシトシンの蓄積を認めたが, UTAR 8 以前の菌株ではシトシンの蓄積は認められなかった。KCY 64 と同時に分離した 2-fluoroadenine 耐性株 KCY 69 および, KCY 64 から誘導した多数の変異株でもシトシンの蓄積が認められた。以上の結果から, 2-fluoroadenine 耐性の付与が, シトシン生産に大きく影響していると考えられる。

3. グルコースと甘蔗廃糖蜜の混合使用

われわれは先に, L-ヒスチジン⁽⁸⁾, アデニン⁽⁹⁾あるいはウロカニン酸⁽⁶⁾の発酵生産において, 炭素源としての甘蔗廃糖蜜とグルコースの混合比を変えると, 生産性が変化することを認めた。そこで, 同様の効果をシトシンの生産について KCYT 95 を用いて調べた。その結果は, Fig. 3 に示すとおり, 炭素源としてグルコース単独で使った時よりも, グルコースに甘蔗廃糖蜜を混合し

た時の方が, シトシンの蓄積は増加し, グルコース 3.75%, 甘蔗廃糖蜜 11.25% (糖濃度換算) の時 2.3 mg/ml のシトシンが蓄積した。

4. 天然栄養源の添加効果

KCYT 95 を使用し, 甘蔗廃糖蜜 11.25% (糖濃度換算), グルコース 3.75%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4% を含む培地で

Fig. 3. Effect of Cane Molasses on Cytosine Production by *B. ammoniagenes* KCYT 95.

* As sugar concentration. Nitrogen source : 4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nutrient : 1% meat extract.

Fig. 4. Effect of Natural Nutrients on Cytosine Production by *B. ammoniagenes* KCYT 95. Sugar : 3.75% glucose + 11.25% (as sugar concentration) cane molasses. Nitrogen source : 4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. * UV-absorption density on paperchromatogram of adenine accumulated as by-product is given with marks -, ±, +, ++ and +++, which approximately correspond to the amounts of 0, 0.5, 0.7, 1.3 and 1.5 mg/ml, respectively.

*Adenine by-produced ± + - - - - ± + ± - - ± - - - ± ± - ++++++

Fig. 5. Effect of Nitrogen Sources on Cytosine Production by *B. ammoniagenes* KCYT 95. Sugar : 3.75% glucose+11.25% (as sugar concentration) cane molasses. Nutrient : no addition. Other details are the same as those in the legend of Fig. 3.

で、シトシン蓄積に対する天然栄養源の添加効果を調べた。その結果は Fig. 4 に示すとおりであり、肉エキスを添加した場合は、シトシンの蓄積量は増加し、肉エキス 0.5~1.0% 添加の時 1.5 mg/ml のシトシンの蓄積が認められた。その他、コーンスチープ・リカー、酵母エキス、ペプトン、ポリペプトンの添加効果は顕著でなかった。また Fig. 4 に示すように、多くの培養条件でアデニンが副生産された。

5. 無機窒素源の添加効果

KCYT 95 を使用し、甘蔗廃糖蜜 11.25% (糖濃度換算)、グルコース 3.75%、天然栄養源無添加培地で、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸一アンモニウムを添加した時のシトシンの蓄積に対する影響を調べた。その結果は Fig. 5 に示すとおりであり、硝酸アンモニウム添加培地でのシトシンの生産が比較的良効であった。また、この場合も微量のアデニンの副生産が認められた。

6. アデニン添加の効果

B. ammoniagenes において、2-fluoroadenine 耐性の付与は多くの場合アデニンの分泌を伴い⁽⁶⁻⁹⁾、前項までに述べたシトシン発酵においてもアデニンが副生産される。そこで、シトシン蓄積の原因として、2-fluoroadenine 耐性を付与することによって、菌体内のアデニン含量が増加し、そのアデニンが、ピリミジン合成を促進してシトシンが蓄積するのではないかと考え、シトシン生産培地にアデニンを 0.25~1 mg/ml 添加した培地で *B. ammoniagenes* ATCC 6872 (野生株) を培養したが、培養液中にシトシンの蓄積は認められなかった。

7. 2-fluoroadenine による生育阻害とその回復

先に述べたように、2-fluoroadenine 耐性の性質が、

シトシン蓄積の主な原因となっている可能性が考えられた。このことから、*B. ammoniagenes* において、2-fluoroadenine がピリミジンのアナログとして作用する可能性が考えられたので、*B. ammoniagenes* の生育に対する 2-fluoroadenine の阻害をピリミジン類が回復するかどうかを調べた。すなわち、2-fluoroadenine 200 µg/ml を含む最小寒天平板⁽⁸⁾上に、*B. ammoniagenes* ATCC 6872 (野生株) の細胞をぬりつけたのち、寒天表面の一部に 10 mg/ml のシトシンまたはウラシルの溶液を含ませたペーパーディスクを置いて、30°C の温度で培養したが、菌の生育はまったく認められず、これらのピリミジン類には、生育阻害を回復する効果を認めなかった。一方、同様にしてアデニンの効果を調べた結果、ペーパーディスクの周辺に明確な生育が認められた。このことから *B. ammoniagenes* において、2-fluoroadenine は、アデニンのアナログとして作用しており、ピリミジンのアナログとしては作用していないと考えられる。

考 察

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872 から得たウロカニン酸生産菌株の中に、シトシンを蓄積する菌株が認められた。このシトシンの蓄積の原因はわからないが、2-fluoroadenine 耐性の付与が何らかの役割を果していると思われる。2-fluoroadenine 耐性以外の性質が、どの程度シトシン生産に影響しているかは不明である。

Escherichia coli において、一般にはプリン類はピリミジン合成の調節に促進的に作用することが知られている^(10,11)。このことから、*B. ammoniagenes* においても 2-fluoroadenine 耐性の付与によって、アデニン系化合

物が過剰生産され、そのプリン系化合物の細胞内プールの増大が、ピリミジン合成を促進して、シトシンを蓄積する可能性が考えられたが、アデニンを培地に添加してもシトシンの生成促進は認められなかった。シトシンの蓄積するメカニズムは今後解明されなければならない。

要 約

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872 (野生株) から得たウロカニン酸生産菌株の中に、シトシンを蓄積する菌株 KCYT 95 (ウロカナールゼ欠失性, ヒスチジンアナログ耐性, プリンアナログ耐性株) をみいだした。KCYT 95 に至る変異の親株について、そのシトシン生産性を調べた結果、2-fluoroadenine 耐性の付与がシトシン生産にとって重要であることがわかった。

KCYT 95 を用いて、シトシン生産に好適な培養条件を検索した結果、甘蔗廃糖蜜 11.25% (糖濃度換算), グルコース 3.75%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4%, 肉エキス 1% 培地で 2.3 mg/ml のシトシンの蓄積を認めた。

終りに本研究に使用した 2-fluoroadenine を合成していただいた、当研究所の寺西正行氏に深謝します。

- (1) T. Okabayashi; *J. Bacteriol.*, **84**, 1 (1962).
- (2) K. Ogata, A. Imada and Y. Nakao; *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 586 (1962).
- (3) 増尾栄太郎, 岡林 直: 特公昭 40-10957.
- (4) 青木良平, 奥村信二, 百瀬春生, 村松伸紀, 角田俊直, 元崎信一: 特公昭 36-21499.
- (5) 青木良平, 奥村信二, 百瀬春生, 村松伸紀, 角田俊直, 元崎信一: 特公昭 36-19749.
- (6) 小林節子, 荒木和美, 中山 清: 農化, **51**, 543 (1977).
- (7) J. A. Montgomery and K. Hewson: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 463 (1960).
- (8) K. Araki, S. Shimojo and K. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 837 (1974).
- (9) 下条節子, 荒木和美, 中山 清: 農化, **48**, 63 (1974).
- (10) J. C. Gerhart: *Curr. Top. Cell. Regul.*, **2**, 275 (1970).
- (11) R. I. Christopherson and L. R. Finch: *Biochim. Biophys. Acta.*, **481**, 80 (1977).