ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 62, No. 1, pp. 31~33, 1988]

Brevibacterium ammoniagenes の

変異株によるウラシルの蓄積†

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,

*現在, バイオール株式会社座間研究所)

昭和 62 年 8 月 28 日 受理

Uracil-Producing Mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*

Setsuko KOBAYASHI, Kazumi ARAKI

and Kiyoshi NAKAYAMA*

Tokyo Research Laboratory, Kyowa

Hakko Co., Machida, Tokyo 194

* Zama Research Laboratory, Biol Co.,

Zama 228

A 2-fluoroadenine resistant derivative of *B. ammoniagenes* ATCC 6872 (wild-type strain) was found to accumulate a large amount of uracil in the culture medium. The concentration of accumulated uracil reached 3.9 mg/ml with a medium containing 11.25% (as sugar concentration) cane molasses and 3.75% glucose. Adenine accumulated at less than 0.5 kg/ml.

(Received August 28, 1987)

ウラシル系物質が他の核酸成分とともに微生物の培養液中に分泌するという報告^(1,2)や, 各種の細菌による 3', 5'-サイクリックウリジルの製法特許⁽³⁾が知られている。また, 大腸菌⁽⁴⁾や *Brevibacterium ammoniagenes*⁽⁵⁾の野生株を, 6-アザウラシルを含む培地で培養すると, ウリジル酸が蓄積することが知られている。これらの場合, 培地に添加した 6-アザウラシルの代謝生成物がピリミジン生合成の代謝制御に影響を与えて, ウリジル酸の過剰の蓄積を誘発したものと考えられる。さらに, *B. ammoniagenes*⁽⁵⁾では, 培地にオロット酸を添加すると

ほぼ定量的にウリジル酸へ転換して蓄積することが知られている。

変異株を用いる, いわゆる直接発酵によるウラシル系化合物の著量の蓄積については, 最近 *Bacillus* 属細菌のウリジンスクレオチドホスホリラーゼ欠失変異株から誘導したピリミジンアナログ耐性株によるウリジンの製法が特許出願されている⁽⁶⁾。

著者ら⁽⁷⁾は先に, *B. ammoniagenes* の 2-フルオロアデニン (FA) 耐性株が著量のアデニンを蓄積することを報告したが, このような変異株のなかに未知の紫外線吸収物質を蓄積する変異株 BF-93 を見出した。BF-93 の発酵液を, イソ酪酸: 0.5 N アンモニア (10: 6) の溶媒系を用いる薄層クロマトグラフィーで展開後, この未知物質相当部分を分取し, 熱水で抽出して調製したものを試料として, Table I に示す 9 種の展開溶媒でペーパークロマトグラフィーを行ったところ, その *R_f* 値は, 標準ウラシルのそれとよく一致した。また, Table I の溶媒系の B と F, G と H, H と J を使用した 2 次元ペーパークロマトグラフィーでの挙動も標準ウラシルとよく一致した。さらに, 紫外吸収曲線 (Fig. 1) も標準ウラシルのそれとよく一致した。以上の結果から, この未知物

Table I. Paperchromatographic Identification of Uracil Produced by *B. ammoniagenes* BF-93

Solvent system	<i>R_f</i> -value	
	Sample	Authentic uracil
A	0.55	0.57
B	0.53	0.54
C	0.53	0.54
D	0.55	0.56
E	0.21	0.20
F	0.76	0.76
G	0.64	0.68
H	0.47	0.47
I	0.79	0.79

* Solvent system :

A, *n*-butanol-acetic acid-H₂O=5: 2: 2; B, isobutyric acid-0.5 N NH₄OH=10: 6; C, *n*-propanol-0.2 N NH₄OH=3: 1; D, *n*-butanol-acetone-H₂O-diethylamine=10: 10: 5: 2; E, *n*-butanol-H₂O-conc. NH₄OH=172: 18: 10; F, isopropanol-H₂O-conc. HCl=130: 37: 33; G, methanol-ethanol-conc. HCl-H₂O=50: 25: 6: 19; H, isobutyric acid-acetic acid-0.5 N NH₄OH=10: 1: 5; I, methanol-conc. HCl-H₂O=70: 20: 10.

† 本報の概略は, U.S.-Japan Intersociety Microbiology Congress (Los Angeles-Honolulu, May, 1979) で発表した。

質をウラシルと同定した。

BF-93 を用いて, ウラシルの蓄積条件を検討した。培地, 培養条件等は先報⁽⁸⁾に準じ, 発酵培地 20 ml を含むバッフル板付きの 300 ml 容三角フラスコを用いて行った。発酵培地の炭素源としては, 甘蔗廃糖蜜 (11.25%, 糖濃度換算) とグルコース (3.75%) の混合物を用い

Fig. 1. UV-Absorption Curve of Uracil Produced by *B. ammoniagenes* BF-93.

た。窒素源として 0.2% の尿素を含む発酵培地に, 種々の天然栄養物, 無機窒素源を添加して, それらのウラシル蓄積に対する効果を調べた。その結果, 天然栄養物 (Fig. 2) のなかでは肉エキスと酵母エキスの添加が有効であった。肉エキス 1% 添加のとき 2.3 mg/ml のウラシルが蓄積した。この時無添加の基本培地でのウラシルの蓄積量は 0.6 mg/ml であった。ペプトンやコーン・スチープ・リカーの添加はそれほど効果がなかった。次に, 無機窒素源 (Fig. 3) としては, 硫酸アンモニウムと塩化アンモニウムが有効であり, 硫酸アンモニウム 2% (窒素として 0.5%) 添加したとき 2.8 mg/ml のウラシルが蓄積した。いずれの場合もアデニンが副生産されたが, その蓄積量は 0.5 mg/ml 以下であった。

BF-93 は上述のように, きわめて再現性よく著量のウラシルを蓄積したが, これを殺菌水に懸濁希釈して, 保存継代用スラントと同一組成の寒天平板 (肉エキス 1%, ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, NaCl 0.25%, pH 7.2) に塗抹してコロニー状に生育させ, これを

Fig. 2. Effect of Natural Nutrients on Uracil Production by *B. ammoniagenes* BF-93. ----, growth; —, uracil. Fermentation was carried out in a 300-ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of media which had the following basal components: 11.25% (as sugar concentration) cane molasses, 3.75% glucose, 0.2% urea, 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, thiamine·HCl 2.5 mg/l, biotin 200 $\mu\text{g/l}$, β -alanine 100 $\mu\text{g/l}$, Ca-pantothenate 10 mg/l, L-cysteine·HCl 20 mg/ml, 3% CaCO_3 . Refer to the earlier paper⁽⁸⁾ for the other details of the experiment.

Fig. 3. Effect of Inorganic Nitrogen Sources on Uracil Production by *B. ammoniagenes* BF-93. For the details of the experiment, refer to the legend to Fig. 2.

釣菌して生産試験を行うと、たとえば 105 株の培養で、すべてがアデニンを蓄積するが、ウラシルを全く蓄積しない現象を認めた。この際、対照として同様に培養した BF-93 は正常にウラシルを蓄積した。そこで、殺菌水の代りに、種培地で懸濁・希釈して上述と同様にモノコロニー分離を行うと、*B. ammoniagenes* の通常の色調のコロニー 41 個に対して、黄色の色調の濃いコロニーが 24 個発現した。この黄色の色調の濃い 24 菌株と、通常の色調のコロニーのうち 27 株とを、発酵試験にかけたところ、前者では 11 株が 2.6~3.9 mg/ml のウラシルを蓄積したが、後者では全くウラシルの蓄積が認められなかった。最もウラシル蓄積量の高かった ISY-5 と名づけた株ではウラシル 3.9 mg/ml、アデニン 0.4 mg/ml を蓄積した。このとき対照とした BF-93 ではウラシル 2.3 mg/ml、アデニン 0.45 mg/ml を蓄積した。

BF-93 には、黄色の色調の濃いウラシル生産菌と、通常の色調のアデニン生産菌が混在していて、殺菌水で懸濁・希釈する操作の過程で、黄色のウラシル生産菌が死滅すると考えると上述の現象が理解できる。

このような FA 耐性の付与によって、アデニンとともにウラシルが蓄積する原因はわからないが、先報⁽⁶⁾で報告したように、同じ *B. ammoniagenes* の FA 耐性株でアデニンとともにシトシンの蓄積する現象が認められているので、FA 耐性の付与によって、何らかの機構でプリンとピリミジンの両方の生合成が同時に促進されるものと考えられる。

- (1) T. Okabayashi: *J. Bacteriol.*, **84**, 1(1962).
- (2) K. Ogata, A. Imada and Y. Nakao: *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 586 (1962).
- (3) 石山二郎: 特開昭 50-18691.
- (4) R. E. Hundschumacher: *Nature*, **182**, 1090 (1958).
- (5) K. Nakayama and H. Tanaka: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 518 (1971).
- (6) 常見 裕, 朝日 知, 土屋宗晴: 特開昭 61-104795.
- (7) 下条節子, 荒木和美, 中山 清: 農化, **48**, 63 (1974).
- (8) 小林節子, 荒木和美, 中山 清: 農化, **52**, 129 (1978).