報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 67, No. 5, pp. 843~847, 1993]

イノシン生産菌からアデニン要求復帰変異株の誘導と
そのアデノシン蓄積†

西山 徹*, 中松 亘*, 前田 治**

(味の素株式会社東海工場技術室)

平成 4 年 10 月 26 日 受 理

Adenosine Production by an Adenine Revertant
Derived from an Inosine Producer
(Industrial Production of Adenosine, part I)

Toru NISHIYAMA*, Tsuyoshi NAKAMATSU*, and Osamu MAEDA**

Engineering Department, Tokai Plant of Ajinomoto Co., Inc., Yokkaichi, Mie 510

An adenosine producer (an adenine revertant), *Bacillus subtilis* A 3-5, was derived from an inosine producer, *B. subtilis* AJ-11102, which had the genetic properties of adenine auxotrophy, xanthine auxotrophy, 8-azaguanine resistance, and sulfaguanidine resistance. A 3-5 produced 9 g/l adenosine from 80 g/l glucose in 104 h. It could be used industrially because productivity was high and stable.

(Received October 26, 1992)

緒 言

イノシン酸およびグアニル酸が調味料として工業的な価値をもって以来、これらヌクレオチドの工業的な製造技術は、わが国において飛躍的に発展した。これらヌクレオチドの製造法は大別して、1) 酵母 RNA の酵素分解、2) イノシン、グアニシンのヌクレオシド発酵生産とこれらヌクレオシドの化学的な 5' 位リン酸化、3) ヌクレオチドの直接発酵生産の 3 種類に分類できる。

ヌクレオシドの一種であるアデノシンは、アデノシン自体はもとより、ATP、AMP、FAD、アデニンなどの関連化合物も含めて、医薬品や生化学試薬として重要で広く使用されている。

さらに最近、エイズに対する有効な薬として非天然系のヌクレオシドであるジデオキシイノシン (DDI) が実用化され、この工業的な出発原料の 1 つであるアデノシンの安価で大量な供給が必要になった^(1,2)。アデノシンの製造には、従来、酵母 RNA の分解による方法が実用化されてきたが、さらに効率的で安価な工業的な方法が待ち望まれていた。

アデノシン生産菌を育種した例としては、羽田らによる *Bacillus* sp. を用いた報告^(3,4)がある。その報告では、プリン生合成能を強化し、グアニル酸への代謝経路を遮断した菌株 (8-アザキサンチン耐性、キサンチン要求、ヒスチジン要求、スレオニン要求、アデノシンデアミナーゼ欠損、グアニル酸レダクターゼ欠損) はグルコース 100 g/l から最高 16 g/l のアデノシンを蓄積したが、その菌株のアデノシン蓄積はきわめて不安定であった。この不安定性の原因は、アデノシン生成に重要なキサンチン要求性が高頻度で野生型に復帰するためと考察されている⁽⁴⁾。この菌株の不安定性は、工業化を達成するには、

† アデノシン発酵の工業的確立 (第 1 報)

* Present address: Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., Suzuki-cho, Kawasaki 210

** Present address: Knorr Foods Co., Ltd., Shimonoge, Kawasaki 210

大きな障害となる。そこで、われわれは、アデノシンの高蓄積と同時に高い安定性を示す菌株の育種を目指した。菌株育種の親株としてはすでに工業化されているイノシン生産菌を用い、そのイノシン高蓄積能、高安定性を利用することにした。つまり本菌が欠失しているアデニルコハク酸合成酵素活性を復帰させた変異株を採取することによりアデノシン高蓄積、安定生産が達成できるのではないかと考えた。

イノシン生産菌については多くの報告例⁽⁶⁻¹⁰⁾があるが本報では、工業的イノシン生産菌である *Bacillus subtilis* AJ-11102⁽⁶⁾ を親株とし、そのアデニン要求性（アデニルコハク酸合成酵素活性の欠失）の復帰変異株を採取した。得られた復帰変異株のアデノシン蓄積および、生産安定性について検討した結果を以下に報告する。

実験方法

1. 使用菌株 イノシン生産菌 *Bacillus subtilis* AJ-11102（アデニン要求、キサンチン要求、8-アザグアニン耐性、サルファグアニン耐性）を親株として用いた。本菌は強力なイノシン生産菌で、80 g/l のグルコースから 20 g/l のイノシンを蓄積する。

2. 変異操作 変異剤として *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトログアニジン (NG) を使用した。変異条件は、NG 500 μg/ml, 0°C, 30 分で行った。

3. 培地・培養条件 培地は、以下の5種類の培地を用いた。

培地1（最少培地）：グルコース 20 g, NH₄Cl 5 g, L-グルタミン酸 1 g, クエン酸ナトリウム 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, FeSO₄·7 H₂O 0.01 g, MnSO₄·5 H₂O 0.01 g, グアニン 0.1 g を蒸留水で 1 l に調製 (pH 7.0, 115°C, 10 分殺菌) した。固体培地を調製する際には、20 g/l になるように寒天を添加した。

培地2（リフレッシュ用培地）：酵母エキス 5 g, ポリペプトン 5 g, 可溶性澱粉 30 g を蒸留水で 1 l に調製 (pH 7.0, 115°C, 15 分殺菌) した。固体培地を調製する際には、20 g/l になるように寒天を添加した。

培地3（種培地）：グルコース 30 g, NH₄Cl 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, FeSO₄·7 H₂O 0.01 g, MnSO₄·5 H₂O 0.01 g, 味液（総窒素 30 g/l）40 ml, 尿素 2 g, グアニン 0.06 g, 酵母エキス 0.5 g, 消泡剤（アデカノール）0.5 ml を蒸留水で 1 l に調製 (pH 6.5, 115°C, 15 分殺菌) した。

培地4（生産培地）：グルコース 80 g, NH₄Cl 15 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, FeSO₄·7 H₂O 0.01 g, MnSO₄·5 H₂O 0.01 g, KCl 2 g, グアニシンの塩酸処理物（グアニシン 12.5 g/l N HCl 1 l, 100°C, 60 分処理）0.8 ml, 味液（総窒素 30 g/l）20 ml, 消泡剤（アデカノール）0.5 ml を蒸留水で 1 l に調製 (pH 6.5, 115°C, 15 分殺菌) した。中和剤として、別殺菌した CaCO₃ を 25 g/l になるように上記培地に培養前に添加した。

培地5（イノシン生産培地）：グルコース 80 g, NH₄Cl 20 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, FeSO₄·7 H₂O 0.01 g, MnSO₄·5 H₂O 0.01 g, KCl 21 g, RNA 0.5 g, グアニシン 0.375 g, DL-Met 0.3 g, L-Glu 15 g, 味液（総窒素 30 g/l）32 ml, 消泡剤（アデカノール）0.5 ml を蒸留水で 1 l に調製 (pH 6.5, 115°C, 15 分殺菌) した。中和剤として、別殺菌した CaCO₃ を 30 g/l になるように上記培地に培養前に添加した。

培養は、試験管（3 ml/20 ml 試験管）および坂口フラスコ（20 ml/500 ml フラスコ）で行った。リフレッシュ用培地で 34°C, 16 時間培養した菌をそれぞれの培地に 1 白金耳接種し、34°C, 72~96 時間、振盪培養した。通気攪拌培養には、300 ml 張込みのガラスジャーを用い、培養液の pH 中和剤としては、アンモニアガスを使用した。

4. 分析および生産物の同定 培養液中のアデノシンの分析は以下に示す液体クロマトグラフを用いて以下の条件で実施した。

カラム：陰イオン交換樹脂 CA 08 S（三菱化成 内径 8 mm×10 cm）、温度：55°C、検出波長：254 nm、バッファ：0.2 M ギ酸アンモニウム+0.2 M NaCl (pH 5.5)、流速：90 ml/h、リテンションタイム：8 min。

培養液中のグルコース濃度はグルコースオキシダーゼを用いる酵素法により測定した。アデノシンの同定は、培養液を加熱除菌後冷却晶析で得た再結晶標品について ¹³C-NMR, ¹H-NMR（日本電子 EX-400 型、測定溶媒 D₂O、測定範囲 30 kHz (¹³C), 6 kHz (¹H)、データポイント 32 K), FAB マススペクトル分析（日本電子 DX-300 質量分析計）を実施した。

実験結果

1. 親株の選定

アデノシン生産菌育種の親株として重要なことはプリ

Table I. Degradation of Adenosine by *Bacillus subtilis* AJ-11102

Reaction time (h)	Residual adenosine (g/l)	Degradation products (g/l)		
		Ade	HxR	Hx
0	8.98	0.002	tr	tr
5	8.77	0.018	tr	tr
24	8.78	0.034	tr	tr

Cells of *Bacillus subtilis* AJ-11102 grown in 20 ml of medium 5 for 48h at 34°C were harvested and washed. The reaction mixture in a total volume of 20ml of 50 mM potassium phosphate buffer (pH7.0) contained 9g/l of adenosine and the cells harvested from 20ml of culture broth. The reaction was carried out at 34°C.

Ade, adenine; HxR, inosine; Hx, hypoxanthine; tr, trace.

ン生合成能が高いこと、アデニル酸、グアニル酸による代謝制御が解除もしくは軽減されていること、および生成したアデノシンが分解を受けずに培地中に蓄積することが重要と考えられる。この条件に見合う菌株として工業的に使用されているイノシン生産菌、*Bacillus subtilis* AJ-11102 が最適と判断した。しかし、上記条件のうちアデノシン分解活性については未確認であった。その点についてチェックを行ったところ、Table I に示すように本菌のアデノシン分解能は認められず、親株として適していることが判明した。

2. アデニン要求復帰変異株の取得

イノシン生産菌 AJ-11102 を固体培地 2 でリフレッシュした後、さらに培地 2 を用いて 34°C、16 時間液体培養した。集菌後、0.02 M リン酸バッファーで洗浄し、変異処理した。変異前生菌数 3.2×10^7 /ml、死滅率 98.1% であった。この処理菌体を上記バッファーで 3 回洗浄し、固体培地 1 に塗抹し、34°C、96 時間培養した。その結果、アデニン非存在下の最少培地（固体培地 1）に生

育した菌株を 30 株選出した。

3. アデニン要求復帰変異株のアデノシン蓄積能

採取された復帰変異株 30 株についてアデノシンの蓄積能を調べた。そのなかで高いアデノシン蓄積能を示した菌株が 5 株得られた。

その発酵試験結果を Table II に示した。A3-5 以外の株は、グルコースをほとんど完全に消費し、グルコース様の還元物質であるアセトインを多量に副生することが判明した。これに対し A3-5 株は、グルコースは完全消費しなかったが、アセトインの副生が少量であった。このことより、アセトインの副生が少なく、アデノシンの対消費糖収率が優れている A3-5 株を今後の代表株として選出した (Table II)。さらに本菌の培養液中には、親株が生産していたイノシンの蓄積が認められず、また、ヌクレオシダーゼおよびヌクレオシドホスホリラーゼの分解副生物であるアデニンもまったく検出されず、使用菌株として適していることが判明した。

4. 菌株の安定性

最初に得られたアデノシン生産菌は培養ロットによるアデノシン発酵成績が不安定であった。そこでモノコロニー分離を実施し、坂口フラスコ培養でアデノシン生産性を調べたところ、Table III に示すように各コロニー間のバラツキが大きいことが判明した。一方、羽田ら⁽⁴⁾によればキサンチン要求復帰変異株の出現が 1% を超えればほとんどアデノシン蓄積は認められないことが示されている。しかし Table III の結果からはキサンチン要求復帰変異株の出現が Table III に示した程度 (4% 以内) ではアデノシン生産と復帰変異株出現との間に明らかな相関が認められず、菌株の不安定性要因として復帰変異株出現頻度だけでは説明できないと考えられた。そこで、アデノシン生産性安定化の目的で 8-アザアデニン 500 mg/l を含む最少培地（培地 1）上で繰り返しモノコロニー分離を行ったところ復帰変異株の出現は抑

Table II. Production of Adenosine by Adenine Revertants Derived from AJ-11102

Strains	Adenosine produced (g/l)	Residual glucose (g/l)	Acetoin produced (g/l)	Adenosine yield* (%)
A3-5	7.5	21	6.3	12.7
No. 601	4.8	0.4	33.7	6.3
No. 717	5.7	0	29.4	7.1
A3-15	5.9	0	16.8	7.3
A3-24	5.6	0.4	27.9	7.4

Strains indicated in the table were cultured in 20ml of medium 4 at 34°C for 96h.

*Adenosine produced (g)/Glucose consumed (g)×100

Table III. Adenosine Productivity of the Colonies Isolated from Strain A-35

Colony No.	Adenosine produced (g/l)	Residual glucose (g/l)	Adenosine yield* (%)	Ratio of revertant** (%)
1	8.2	18.0	12.3	0.02
2	4.2	29.0	7.5	0.83
3	8.0	15.5	11.5	0.95
4	4.0	26.5	6.8	1.02
5	4.3	26.0	7.3	2.00
6	8.3	20.0	12.8	3.81
7	5.6	25.5	9.4	0.54
8	4.3	27.5	7.5	1.98
9	3.3	24.0	5.4	0.07
10	5.8	18.0	8.7	0.53

* Adenosine produced (g)/Glucose consumed (g)×100

** Number of revertants/Total viable cells×100

Table IV. ¹³C Chemical Shift and Assignments of the Product (Adenosine)

¹³ C	Chemical shifts (ppm)	Carbon type
6	156.7	S
2	153.6	D
4	149.5	S
8	141.6	D
5	120.1	S
10	89.3	D
13	86.7	D
12	74.6	D
11	71.6	D
14	62.5	T

S, quaternary carbon; D, methine;
T, methylene.

えられなかったが、ほぼ安定した生産性 (9 g/l, 12%; 300 ml 張込みガラスジャー) の菌株を得ることができた。しかしなおキサンチン要求性の復帰変異株の出現は培養のスケールアップを考えたとき、必ず大きな問題となると予想された。そこでさらに変異処理を繰り返しアデノシン生産性の向上と同時に復帰変異株出現頻度を大幅に低下させ工業用生産菌にした。これについては次報でくわしく報告する。

5. アデノシンの同定

ガラスジャーで培養して得た発酵ブロス 100 ml を 60~70°C に加温し、完全に生成物を溶解させた後、遠心分離機 (6000 g) にて除菌した。上清を 5°C, 16 時間静置して粗結晶を得た。ガラスフィルターで濾過し、結晶を水洗した後、熱水 20 ml で溶解した。溶解液を 5°C, 16 時間静置し、再結晶 0.7 g を得た。この再結晶品につ

Table V. ¹H Chemical Shifts and Coupling Constants of the Product (Adenosine)

¹ H	Chemical shifts (ppm)	Coupling constants shape (Hz)
8	8.32	S
2	8.23	S
1'	6.07	J _{1'2'} =6.1, D
2'	4.80	J _{1'2'} =6.1, J _{2'3'} =5.3, DD
3'	4.44	J _{2'3'} =5.3, J _{3'4'} =3.5, DD
4'	4.30	J _{3'4'} =3.5, J _{4'5'} =2.9, J _{4'5'} =3.7, M
5'	3.93	J _{5'5''} =12.8, J _{4'5'} =2.9, DD
5''	3.85	J _{5'5''} =12.8, J _{4'5''} =3.7, D

S, singlet; D, doublet; DD, double doublet;
M, multiplet.

いてマスマスペクトル分析を行った。測定されたプロトン化分子イオン (268, MH⁺) から得られる分子量はアデノシンの分子量 267 に相当する。

また、この再結晶品についてアデノシン標品を対象にし ¹³C-NMR, ¹H-NMR 測定を行ったところ、再結晶品とアデノシン標品のスペクトルは化学シフト、スピン結合定数ともに良い一致を示した (Table IV, V)。したがって、発酵ブロスから分離した発酵生産物はアデノシンであると同定された。

考 察

アデノシン生産菌株の性質として重要なことは次の 4 点であると考えた。(1) アデニル酸によるプリン合成のフィードバック制御の解除、(2) イノシン酸からグアニル酸への変換を遮断、また、これによりグアニル酸によるプリン合成のフィードバック制御の解除、

(3) アデノシン分解能の欠失, (4) 菌株の安定性 (アデノシン生産性株はそのアデノシン蓄積能が不安定であることが知られており, 安定化が工業化には不可欠である). 以上の4点を満足する菌株を育種するにあたり最も重要なことは親株の選定であると考えた. アデニル酸生成能が高く, しかもグアニル酸生成能を欠損している菌株になりうる可能性が高いという観点から, イノシン生産菌 AJ-11102 が最も適していると考えた. イノシン生産菌はサクシニルアデニル酸合成酵素活性が欠失しているので, この酵素活性のみを復帰させ, しかも, アデニンアナログ耐性を付与することにより上記(1), (2)の条件を満たすことが可能と考えた. またイノシン生産菌はヌクレオシダーゼ, ヌクレオシドホスホリラーゼ活性が検出されないことから(3)の条件にも近いと考えられた. そこで, アデノシン分解能についてもチェックしたところ Table I に示すとおり AJ-11102 はアデノシン分解能がないことも判明した. 上記考えに沿って本報告では AJ-11102 のアデニン非要求株を採取したところ高いアデノシン蓄積能を示す菌株が得られた.

しかし, この菌株のアデノシン蓄積は親株のイノシン蓄積から予想される成績より低いものであった. その原因としては, 親株のイノシン生産菌では, 培地中のアデニン添加量を調節して菌体内アデニル酸のプールが高くないように制御していたため, アデニル酸によるフィードバック阻害が解除され, イノシン生産に対して阻害的にはならないが, アデノシン生産菌 A 3-5 では, 菌体内アデニル酸のプールが高くなり, アデニル酸によるフィードバック阻害が高レベルになっている可能性が強いと考えられた.

一方, アデノシン生産菌の安定性についての羽田ら⁽⁴⁾の報告によると, キサンチン要求性の復帰変異の出現が生産性が不安定となる大きな要因であることが指摘されている. われわれの育種したアデノシン生産菌にもキサンチン要求復帰変異株の出現が認められた. しかし, 羽田らのいう復帰変異株の出現頻度(1%)程度ではアデノシン蓄積との間に相関が認められなかった. このことは, キサンチン要求の復帰変異株自体のアデノシン生産能の低下が原因ではなく, 復帰変異株そのものが生産する物質等による副次的なアデノシン生産抑制, もしくはアデノシン生産菌自体の不安定性が考えられる. 本報告のアデノシン生産菌の不安定性の原因は明らかではなかったが, コロニー分離を繰り返すことによりほぼ安定化

することができた. 復帰変異株出現とスケールアップ上の問題はなお課題として残されている. この課題解決については次報で報告したい.

要 約

イノシンを効率的に生産する *Bacillus subtilis* AJ-11102 を用いて工業的に意味のあるアデノシン生産菌を育種した. AJ-11102 の遺伝的性質はアデニン要求, キサンチン要求, 8-アザグアニン耐性およびサルファグアニジン耐性であった. これより誘導されたアデニン要求復帰変異株 A 3-5 は, 80 g/l のグルコースから, 104 時間で 9 g/l のアデノシンを蓄積した. 本菌のアデノシン蓄積は安定していた.

本研究を遂行するにあたり, 有益なご意見, ご助言をいただきました東京大学農学部教授児玉 徹博士, 東京大学農学部助教授大森俊雄博士, 九州大学農学部教授石崎文彬博士, 味の素株式会社久保田浩二博士, 柴井博四郎博士, 横関健三博士, 山本晃隆研究員, 石井俊昌研究員, ならびに実験協力をいただきました一海忠俊氏に心より感謝いたします.

- (1) 白神 浩, 入江康夫, 岩上寿夫: 日本公開特許公報 02-117689 (May 2, 1990).
- (2) 横関健三, 白江英之, 小林克徳: 日本公開特許公報 02-291291 (Dec. 3, 1990).
- (3) K. Haneda, A. Hirano, R. Kodaira, and S. Ohuchi: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1906—1912 (1971).
- (4) K. Haneda, K. Komatsu, R. Kodaira, and H. Ohsawa: *Amino Acid Nucleic Acid*, 発酵と代謝, **26**, 15—23 (1972).
- (5) H. Matsui, K. Sato, H. Enei, and K. Takinami: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2347—2352 (1982).
- (6) R. Aoki, H. Momose, Y. Kondo, N. Muramatsu, and T. Tsuchiya: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 387—396 (1963).
- (7) K. Ishii and I. Shiio: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1511—1522 (1972).
- (8) K. Sasajima, I. Nogami, and M. Yoneda: *Amino Acid Nucleic Acid*, 発酵と代謝, **20**, 153—161 (1969).
- (9) A. Furuya, S. Abe, and S. Kinoshita: *Appl. Microbiol.*, **20**, 263—270 (1970).
- (10) Y. Kotani, K. Yamaguchi, F. Kato, and A. Furuya: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 399—405 (1978).