

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4385611号  
(P4385611)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
<b>C 1 2 P</b> 19/32 (2006.01)	C 1 2 P 19/32 Z
<b>C 1 2 P</b> 19/40 (2006.01)	C 1 2 P 19/40
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 R 1/125 (2006.01)	C 1 2 P 19/32 Z
請求項の数 8 (全 19 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-29752 (P2003-29752)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成15年2月6日(2003.2.6)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2003-259861 (P2003-259861A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成15年9月16日(2003.9.16)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成18年1月18日(2006.1.18)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	2002103333	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成14年2月11日(2002.2.11)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	ロシア(RU)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
微生物の受託番号	VKPM B-8245	(74) 代理人	100126505
微生物の受託番号	VKPM B-8246		弁理士 佐貫 伸一
前置審査		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 プリンヌクレオシドおよびヌクレオチドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリミキシン B および / または コリスチン による 生育 阻害 に対する 耐性 を 有し、かつ 親株 よりも 高い プリンヌクレオシド 生産能 を 有する バチルス 属 細菌 であって、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) または バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amiloliquefaciens) に 属する バチルス 属 細菌。

【請求項2】

前記 プリンヌクレオシド は イノシン である 請求項 1 に 記載 の 細菌。

【請求項3】

前記 プリンヌクレオシド は キサントシン である 請求項 1 に 記載 の 細菌。

【請求項4】

前記 プリンヌクレオシド は グアノシン である 請求項 1 に 記載 の 細菌。

【請求項5】

請求項 1 ~ 4 の いずれか 一 項 に 記載 の 細菌 を 培地 で 培養 し、プリンヌクレオシド を 生成 し て 培地 中 に 蓄積 させ、同培地 から プリンヌクレオシド を 採取 する こと を 特徴 と する プリンヌクレオシド の 製造 方法。

【請求項6】

請求項 1 ~ 4 の いずれか 一 項 に 記載 の 細菌 を 培地 で 培養 し、生成、蓄積 した ヌクレオシド を リン酸 化 し、生成、蓄積 した プリンヌクレオチド を 採取 する こと を 特徴 と する プリンヌクレオチド の 製造 方法。

## 【請求項 7】

前記プリンヌクレオチドは 5' - イノシン酸、5' - キサンチル酸または 5' - グアニル酸である請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

請求項 3 に記載の細菌を培地で培養し、生成蓄積したキサントシンをリン酸化し、生成、蓄積した 5' - キサンチル酸をアミノ化し、そして生成蓄積した 5' - グアニル酸を採取することを特徴とする 5' - グアニル酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、イノシン、キサントシン、グアニシンのようなプリンヌクレオチドを製造するための発酵方法、ならびに同方法に使用する新規微生物に関する。プリンヌクレオチドは、5' - イノシン酸、5' - キサンチル酸および 5' - グアニル酸のような相当するヌクレオチドの合成のための原料として使用される。

10

## 【0002】

## 【従来の技術】

従来、ヌクレオチドは、アデニン栄養要求株、またはこれらの株にプリンアナログ、サルファ剤、メチオニンアナログおよび抗葉酸剤のような種々の薬剤に対する耐性が付与した株を用いた発酵法により工業的に生産されてきた。ヌクレオチド生産株として、パチルス属に属する菌株（特許文献 1 ~ 9）、またはプレバクテリア属に属する菌株（特許文献 10 ~ 12、非特許文献 1）、またはエシェリヒア属に属する菌株（特許文献 13）等が利用され得る。

20

## 【0003】

従来、これらの変異株の取得は、微生物を、変異を誘発する線量の電離放射線（紫外線、X線、 $\gamma$ 線）の照射、または化学薬剤（硝酸ナトリウム、硫酸ジエチル、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン）に曝し、その後、適切な選択培地を用いることで所望の菌株を選択することによってなされてきた。

## 【0004】

ストレス（温度、放射線照射、飢餓、阻害剤および抗生物質）の下に微生物細胞を曝すような種々の処理、あるいは定常期への移行により、RNA および DNA の崩壊を誘発し、その後核酸誘導体が排出され得ることはよく知られている（非特許文献 2 ~ 4）。今日では、細胞膜を介した代謝産物の透過は、通常は、多かれ少なかれ特定の排出輸送タンパク質により媒介されることが一般に知られている（非特許文献 5 ~ 7）。UV または X 線照射したエシェリヒア・コリ細胞は、遊離塩基、リボース配糖体、モノヌクレオチドおよび ATP を排出することがかなり以前に示されていた（非特許文献 8）。これらの排出は、DNA 断片またはペプチドは検出されなかったことから、細胞溶解の結果として生じたものではない。

30

## 【0005】

## 【特許文献 1】

特公昭 38 - 23039 号公報

40

## 【特許文献 2】

特公昭 54 - 17033 号公報

## 【特許文献 3】

特公昭 55 - 2956 号公報

## 【特許文献 4】

特公昭 55 - 45199 号公報

## 【特許文献 5】

特開昭 56 - 162998 号公報

## 【特許文献 6】

特公昭 57 - 14160 号公報

50

- 【特許文献 7】  
特公昭 57 - 41915
- 【特許文献 8】  
特開昭 59 - 42895 号公報
- 【特許文献 9】  
特開平 06 - 113876 号 (1992 年)
- 【特許文献 10】  
特公昭 51 - 5075 号公報
- 【特許文献 11】  
特公昭 58 - 17592 号公報 10
- 【特許文献 12】  
特公昭 02 - 174689 号
- 【特許文献 13】  
国際公開第 9903988 号パンフレット
- 【非特許文献 1】  
Agric. Biol. Chem., 42, 399 (1978)
- 【非特許文献 2】  
A. Demain (1968)、Production of purine nucleotides by fermentation. In: Progress in Industrial Microbiology, Vol. 18. Ed. D.J.D. Hockenhull. J.&A. Churchill Ltd . London 20
- 【非特許文献 3】  
Cohen and Kaplan. J. Bacteriol., 129, 651-657, (1977)
- 【非特許文献 4】  
Rinas et al., Appl. Environ. Microbiol., 61, 4147-4151, (1995)
- 【非特許文献 5】  
Pao et al., 1988. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 1-34
- 【非特許文献 6】  
Paulsen et al., 1988. J. Mol. Biol., 277, 573-592
- 【非特許文献 7】  
Saier et al., 1999. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (1999) 1, 257-279 30
- 【非特許文献 8】  
Billen, D. (1957), Arch. Biochem. Biophys., 67, 333-340
- 【0006】  
【発明が解決しようとする課題】  
本発明は、ヌクレオシド生産株によるヌクレオシド生産能を高めること、及びその株を用いたイノシン、キサントシンおよびグアノシン等のプリンヌクレオシドの製造方法、ならびに 5'-イノシン酸、5'-キサントシル酸および 5'-グアニル酸等のプリンヌクレオチドの製造方法を提供することを課題とする。
- 【0007】  
【課題を解決するための手段】 40  
本発明者は、細胞膜の構造および/または機能に影響を及ぼす幾つかの変異が、ストレス状態を模倣して、特定の輸送体の活性増大を誘導し、その結果、培地中のプリンヌクレオシド、好ましくはイノシンおよびキサントシンのような核酸誘導体の蓄積を増大させ得ると推測した。そのために、本発明者は、バチルス属に属し、ポリミキシン B およびコリスチン等のペプチド抗生物質に対する耐性を付与する新規な変異を有する微生物が、かなり多い量のプリンヌクレオシドを生成し、培地中に蓄積し得ることを見出した。これまで、プリンヌクレオシドの生産能が、プリンヌクレオシド生産菌にこのような性質を付与することで向上するという事は知られていなかった。そして、この知見に基づいて研究を続け、本発明を達成するに至った。
- 【0008】 50

すなわち、本発明は、バチルス属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する細菌を提供する。特に、本発明は、ポリミキシンBおよびコリスチン等のペプチド抗生物質に対する耐性を付与する変異によりプリンヌクレオシド生産能が向上した細菌を提供する。

【0009】

本発明はさらに、前記細菌を培地で培養し、プリンヌクレオシドを生成して培地に蓄積させ、同培地からプリンヌクレオシドを採取することを特徴とする発酵によりプリンヌクレオシドを製造する方法を提供する。

【0010】

本発明はさらに、本発明の細菌を培地で培養し、生成、蓄積したヌクレオシドをリン酸化し、生成、蓄積したプリンヌクレオチドを採取することを特徴とする5'-イノシン酸、5'-キサンチル酸および5'-グアニル酸等のプリンヌクレオチドの製造方法を提供する。

10

【0011】

本発明はさらに、前記細菌を培地で培養し、生成蓄積したキサントシンをリン酸化し、生成、蓄積した5'-キサンチル酸をアミノ化し、生成、蓄積した5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造方法を提供する。

【0012】

本発明は、以下のとおりである。

(1) ポリミキシンBおよび/またはコリスチンによる生育阻害に対する耐性を有し、かつプリンヌクレオシド生産能を有するバチルス属細菌。

(2) バチルス・ズブチリスに属する(1)に記載の細菌。

20

(3) バチルス・アミロリケファシエンスに属する(1)に記載の細菌。

(4) 前記プリンヌクレオシドはイノシンである(1)~(3)のいずれかに記載の細菌。

(5) 前記プリンヌクレオシドはキサントシンである(1)~(3)のいずれかに記載の細菌。

(6) 前記プリンヌクレオシドはグアノシンである(1)~(3)のいずれかに記載の細菌。

(7) (1)~(6)のいずれかに記載の細菌を培地で培養し、プリンヌクレオシドを生成して培地中に蓄積させ、同培地からプリンヌクレオシドを採取することを特徴とするプリンヌクレオシドの製造方法。

30

(8) 前記プリンヌクレオシドはイノシンである(7)に記載の方法。

(9) 前記プリンヌクレオシドはキサントシンである(7)に記載の方法。

(10) 前記プリンヌクレオシドはグアノシンである(7)に記載の方法。

(11) (1)~(6)のいずれかに記載の細菌を培地で培養し、生成、蓄積したヌクレオシドをリン酸化し、生成、蓄積したプリンヌクレオチドを採取することを特徴とするプリンヌクレオチドの製造方法。

(12) 前記プリンヌクレオチドは5'-イノシン酸である(11)に記載の方法。

(13) 前記プリンヌクレオチドは5'-キサンチル酸である(11)に記載の方法。

(14) 前記プリンヌクレオチドは5'-グアニル酸である請求項(11)に記載の方法。

40

(15) (5)に記載の細菌を培地で培養し、生成蓄積したキサントシンをリン酸化し、生成、蓄積した5'-キサンチル酸をアミノ化し、そして生成蓄積した5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

<1> 本発明の細菌

本発明の細菌は、プリンヌクレオシド生産能を元々有する細菌に、特定の耐性を付与することにより得ることができる。あるいは、本発明の細菌は、特定の耐性を有する細菌に、プリンヌクレオシド生産能を付与することによっても得ることができる。

50

## 【 0 0 1 4 】

「ポリミキシン B および / または コリスチン による 生育 障害 に対する 耐性 を 有する 微生物」という用語は、親株としての細菌株に由来し、ポリミキシン B および / または コリスチン等のペプチド抗生物質を含有する培地中で生育できるように、遺伝的に改変された微生物を意味する。

## 【 0 0 1 5 】

例えば、5 mg / l 以上、好ましくは 10 mg / l 以上の濃度のポリミキシン B、または、5 mg / l 以上、好ましくは 10 mg / l 以上のコリスチンを含有する寒天培地上で、3 4 で培養したときに、3 ~ 5 日以内にコロニーを形成することができる細菌は、これらのペプチド抗生物質に耐性である。前記寒天培地としては、L プロス寒天培地が挙げられる。

10

すでに述べた性質に加えて、本発明の細菌は、本発明の範囲を逸脱することなく、種々の栄養要求性、薬剤耐性、薬剤感受性、および薬剤依存性のような他の特定の性質を有してもよい。

## 【 0 0 1 6 】

グラミシジン、ナイジェリシン等と合わせてポリミキシン B および コリスチン ( ポリミキシン F ) は、いわゆる「ペプチド抗生物質」と呼ばれる化合物の部類に属する。それらは、細胞膜の構造および機能に影響を及ぼし、ストレス状態を模倣する。ペプチド抗生物質は、グラム陰性菌に対して有効な化合物である (Vaara, Microbiol. Rev., 56, 395-411, 1992)。本発明者は、ポリミキシンは、バチルス属に属するグラム陽性菌の生育をも阻

20

## 【 0 0 1 7 】

本発明の細菌は、ペプチド抗生物質に対していわゆる「交差耐性」を有してもよい。これは、ペプチド抗生物質の 1 つに対して耐性を有する細菌が、別のペプチド抗生物質に対しても耐性を示し得ることを意味する (実施例参照)。複数のペプチド抗生物質は、同一の作用メカニズムを持つことが示唆されている。例えば、ポリミキシン B および グラミシジン S は、いずれもこれらの抗生物質により高分子合成が阻害される条件下で、緊縮応答を調節するヌクレオチドであるグアノシン四リン酸 (ppGpp) の蓄積を誘導することが示さ

30

## 【 0 0 1 8 】

本明細書で使用する「プリンヌクレオシド生産能」という用語は、プリンヌクレオシドを生成して培地中に蓄積する能力を意味する。「細菌がプリンヌクレオシド生産能を有する」という用語は、液体培地で培養中に、有意な量のプリンヌクレオシドを生成して培地中に蓄積させる能力を細菌が有することを意味する。通常、これは、実施例に記載する条件下で、50 mg / l 以上のプリンヌクレオシドを、より好ましくは 0.5 g / l 以上のプリンヌクレオシドを蓄積する能力を意味する (以下参照)。

## 【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用する「プリンヌクレオシド」という用語は、イノシン、キサントシン、グアノシン及びこれらの混合物を含む。

40

## 【 0 0 2 0 】

本発明の実施に用いられる変異細菌は、紫外線照射、X線照射、放射線照射、および変異誘発化学物質による処理のような従来の変異誘発法により変異誘発を行い、続いてレプリカ法のような従来法による選択をすることによって得ることができる。好ましい変異誘発物質は、N - ニトロ - N' - メチル - N - ニトロソグアニジン (以下、NTG と称する) である。

## 【 0 0 2 1 】

例えば、プリンヌクレオシド生産能を元々有するバチルス属に属する既知の菌株を、変異

50

株を得るために上記のいずれかの処理をし、続いて、その変異がペプチド抗生物質に対する耐性に関して本発明の要件を満たし、そして本発明に適切に使用できるかどうかについて、試験を行う。さらに、得られた菌株を栄養培地中で培養し、親株よりも高い収率でプリンクレオシドを生産する能力を有する株を選択して、本発明に使用する。

【0022】

本発明の要件を満たす菌株は、当業者によく知られている遺伝子組換え技術によっても得ることができる。

【0023】

上記のような耐性に関する性質は、連続的な選択または遺伝子組換え技術により、1つの菌株中で組み合わせてもよい。

【0024】

本発明で使用されるバチルス属細菌の例として、バチルス・ズブチリス (*B. subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amiloliquefaciens*) 等が挙げられる。本発明の実施に使用される菌株の代表例として、バチルス・ズブチリス KMS16pol<sup>R</sup>1-1 (VKPM B-8245)、バチルス・アミロリケファシエンス Col<sup>R</sup>7-105 (VKPM B-8246) がある。本発明によりプリンクレオシドを生産する際に使用される細菌は、ペプチド抗生物質に対する耐性、および高収率でプリンクレオシドを生産する能力以外は、親株と同じ細菌学的性質を有していてもよい。バチルス・ズブチリス KMS16pol<sup>R</sup>1-1 およびバチルス・アミロリケファシエンス Col<sup>R</sup>7-105 は、2002年1月29日に、the Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 113545 Moscow, 1st Dorozhny pr oezd, 1) に、それぞれ受託番号 VKPM B-8245、VKPM B-8246 のもとで寄託され、2003年1月6日に原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されている。

【0025】

本発明の細菌を得るために改良されるべき親株として、バチルス・ズブチリス AJ12707 (FERM P-12951) (特開昭61-13876号)、バチルス・ズブチリス AJ3772 (FERM P-2555) (特開昭62-014794号)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*) NA-1102 (FERM BP-289)、バチルス・ズブチリス NA-6011 (FERM BP-291) およびバチルス・ズブチリス NA-6012 (FERM BP-292) (米国特許第4,701,413号)、バチルス・プミルス Gottheil No.3218 (ATCC No.21005) (米国特許第3,616,206号)、バチルス・アミロリケファシエンス AS15-7 (VKPM B-6134) (ロシア特許第2003678号) 等のバチルス属に属するイノシン生産株が使用できる。また、バチルス・ズブチリス KMS16株を使用してもよい。この株は、プリンリプレッサーをコードする purR 遺伝子 (purR::spc)、スクシニルAMPシターゼをコードする purA 遺伝子 (purA::erm)、およびプリンクレオシドホスホリラーゼをコードする deoD 遺伝子 (deoD::kan) に変異が導入された、既知のバチルス・ズブチリス 168trpC2株の誘導体である。

【0026】

<2> プリンクレオシドの製造方法

本発明の方法は、本発明の細菌を培地中で培養し、プリンクレオシドを生成して培地中に蓄積させ、該プリンクレオシドを培地から採取する、プリンクレオシドの製造方法を包含する。

【0027】

本発明の方法においては、バチルス細菌の培養、液体培地からのプリンクレオシドの採取および精製は、細菌を用いた発酵によりプリンクレオシドを製造する従来法と同様にして行うことができる。

【0028】

プリンクレオシド生産用培地は、炭素源、窒素源、無機イオン、および必要に応じて他の有機成分を含有する限り、合成培地であっても天然培地であってもよい。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、マルトース、キシロース、トレハロース、リボース、およびデンプンの加水分解産物等の糖類、グリセロール、マンニトールおよびソルビトール等のアルコール、グルコン酸、フマル酸、ク

10

20

30

40

50

エン酸およびコハク酸等の有機酸等を使用することができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムおよびリン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、ダイズ加水分解産物等の有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水溶液等を使用することができる。また、ビタミンB<sub>1</sub>等のビタミン、アデニンおよびRNA等の核酸、または酵母抽出物等の必須物質を、極微量有機栄養分として適切な量で含有することが望ましい。これら以外に、必要であれば、少量のリン酸カルシウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等を添加してもよい。

【0029】

培養は、好ましくは、好気性条件下にて16～72時間実施され、培養温度は、30～45の範囲に、pHは、5～8の範囲に制御される。pHは、無機もしくは有機の酸性またはアルカリ性物質、及びアンモニアガスにより調節され得る。

10

【0030】

プリンヌクレオシドの発酵液からの採取は、イオン交換樹脂法および沈殿法のような従来技法のいずれか、またはそれらの任意の組合せにより、行うことができる。

【0031】

<3>プリンヌクレオチドの製造方法

本発明の方法は、本発明の細菌を培地で培養し、生成、蓄積したヌクレオチドをリン酸化し、生成、蓄積したプリンヌクレオチドを採取する、プリンヌクレオチドの製造方法を包含する。具体的には、本発明の方法は、本発明の細菌を培地で培養し、生成、蓄積したイノシンをリン酸化し、生成、蓄積した5'-イノシン酸を採取する、5'-イノシン酸の製造方法を包含する。さらに、本発明の方法は、本発明の細菌を培地で培養し、生成、蓄積したキサンチンをリン酸化し、生成、蓄積した5'-キサンチル酸を採取する、5'-キサンチル酸の製造方法を包含する。

20

【0032】

本発明においては、培養、培地からのプリンヌクレオチドの採取および精製等は、プリンヌクレオチドを微生物を用いて生産する従来の発酵法と同様にして行うことができる。さらに、本発明においては、生成、蓄積したプリンヌクレオチドのリン酸化、および生成、蓄積したプリンヌクレオチドの採取は、プリンヌクレオチドからプリンヌクレオチドを生産する従来の発酵法に類似した様式で実施されてもよい。

【0033】

プリンヌクレオチドのリン酸化は、種々のホスファターゼ、ヌクレオチドキナーゼまたはヌクレオチドホスホトランスフェラーゼを用いて酵素的に、あるいはPOC<sub>1</sub><sub>3</sub>のようなリン酸化剤を用いて化学的に行うことができる。ヌクレオチドへのピロリン酸塩のリン酸基のC-5'位選択的転移を触媒することが可能なホスファターゼ(Mihara et al, Phosphorylation of nucleosides by the mutated acid phosphatase from *Morganella morganii*, Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66:2811-2816)、またはポリリン酸(塩)、フェニルリン酸(塩)もしくはカルバミルリン酸(塩)をリン酸ドナーとして利用する酸性ホスファターゼ(WO 96/37603A1)等を使用してもよい。また、ホスファターゼの一例として、基質としてp-ニトロフェニルリン酸塩(Mitsugi, K., et al, Agric. Biol. Chem. 1964, 28, 586-600)、無機リン酸塩(特開昭42-1186号)またはアセルリン酸塩(特開昭61-41555号)を利用してヌクレオチドのC-2'、3'または5'位へのリン酸基の転移を触媒することが可能なホスファターゼ等を使用してもよい。ヌクレオチドキナーゼの例としては、エシェリヒア・コリ由来のグアノシン/イノシンキナーゼ(Mori et al., Cloning of a guanosine-inosine kinase gene of *Escherichia coli* and characterization of the purified gene product. J. Bacteriol. 1995. 177:4921-4926; WO 91/08286)等を使用してもよい。ヌクレオチドホスホトランスフェラーゼの例として、Hammer-Jespersen, K. (Nucleoside catabolism, p203-258. In A Munch-Petesen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides, and nucleobases in microorganism. 1980, Academic Press, New York)により記載されているヌクレオチドホスホトランスフェラーゼ等を使用してもよい。ヌクレオチドの化学的リン酸化は、POC<sub>1</sub><sub>3</sub>のようなり

30

40

50

ン酸化剤 (Yoshikawa et al, Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1969, 42:3505-3508)等を用いて行うことができる。

【 0 0 3 4 】

本発明の方法は、前記細菌のような細菌を培地で培養し、生成、蓄積したキサントシンをリン酸化し、生成、蓄積した5'-キサントシル酸をアミノ化し、そして生成、蓄積した5'-グアニル酸を採取する、5'-グアニル酸の製造方法を包含する。本発明においては、前記細菌のような細菌の培地での培養、生成、蓄積したキサントシンのリン酸化、生成、蓄積した5'-キサントシル酸のアミノ化、および生成、蓄積した5'-グアニル酸の採取は、5'-キサントシル酸から5'-グアニル酸を生産する従来の発酵法と同様にして行うことができる。

10

【 0 0 3 5 】

5'-キサントシル酸のアミノ化は、例えば、エシェリヒア・コリ由来のGMPシンターゼを用いて酵素的に行うことができる (Fujio et al. High level of expression of XMP aminase in Escherichia coli and its application for the industrial production of 5'-guanylic acid. Biosci. Biotech. Biochem. 1997, 61:840-845、欧州特許第0251489B1号)。

【 0 0 3 6 】

本発明の方法においては、本発明の細菌は、プリンヌクレオチド生合成のための遺伝子発現が高められるように改変してもよい。

20

【 0 0 3 7 】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【参考例1】

バチルス・ズブチリスのイノシン生産菌KMBS16株の構築purR、purA、およびdeoD遺伝子中に挿入-欠失変異を有する変異株であるバチルス・ズブチリスのイノシン生産菌KMBS16株を、バチルス・ズブチリス168 Marburg株から得た。

【 0 0 3 8 】

1) バチルス・ズブチリスのpurR欠損変異株の構築  
バチルス・ズブチリス168 Marburgの染色体DNAを鋳型として、また遺伝子データバンクのDNA配列情報に従って合成したオリゴヌクレオチドプライマーNo. 1 (配列番号1) およびNo. 2 (配列番号2) を用いて、94 で30秒、55 で1分、72 で1分の30サイクルでPCRを行った (Gene Amp PCR System Model 9600, Perkin Elmer)。プライマーNo. 1 (28mer) は、バチルス・ズブチリスpurR遺伝子 (M. Weng, P.L. Nagy, and H. Zalkin. Identification of the Bacillus subtilis pur operon repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 92:7455-7459) の開始コドン上流の246番目~228番目のヌクレオチド由来の配列、および、5'末端に付加したHindIII部位を含む9mer配列から構成される。プライマーNo. 2 (28mer) は、PstI部位を含む9mer配列を5'末端に融合したpurR遺伝子の終止コドンの下流の57~75のヌクレオチド由来の配列である。HindIIIおよびPstIで消化したPCR増幅断片 (0.9 kb) を、pHSG389 (TaKaRa, Japan) の両方の制限酵素部位の間に挿入して、pHSG398BSPRを創製した。増幅されたpurR遺伝子の内部配列であるEcoRV-HincII断片0.3 kbをpHSG398BSPRから除去し、続いて、pDG1726 (Bacillus Genetic Stock Center, Ohio) から切り出したエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) のスペクチノマイシン耐性遺伝子 (1.2 kb) で置き換えた。

30

40

【 0 0 3 9 】

得られたプラスミドpHSG398purR::spcを、Dubnau and Davidoff-Abelsonの方法 (Dubnau, D., and R. Davidoff-Abelson. Fate of transforming DNA followin

50

g uptake by competent *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 1971, 56:209-221) により調製したバチルス・ズブチリス 168 Marburg のコンピテントセルの形質転換に使用した。スペクチノマイシン耐性コロニーから個々に染色体 DNA を調製し、続いて上述の PCR により、ダブルクロスオーバー変異株をスクリーニングした。purR 欠損変異株 (purR::spc) であると確認されたコロニーの 1 つを KMBS4 と命名した。

### 2) バチルス・ズブチリスの purA 欠損変異株の構築

バチルス・ズブチリス 168 Marburg の染色体 DNA を鋳型として、また遺伝子データバンクの DNA 配列情報に従って合成したオリゴヌクレオチドプライマー No. 3 (配列番号 3) および No. 4 (配列番号 4) を用いて、94 で 30 秒、55 で 1 分、72 で 2 分の 30 サイクルで PCR を行った (Gene Amp PCR System Model 9600, Perkin Elmer)。プライマー No. 3 (29mer) は、バチルス・ズブチリス purA 遺伝子の開始コドンの上流の 137 番目 ~ 118 番目のヌクレオチド由来の配列 (P. Mantsala and H. Zalikin. Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* purA and guaA, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 1883-1890)、および 5' 末端に付加した SalI 部位を含む追加の 9mer 配列から構成される。プライマー No. 4 (29mer) は、5' 末端で SphI 部位を含む追加の 9mer 配列を融合した purA 遺伝子の終止コドンの下流の 51 ~ 70 のヌクレオチド由来の配列である。SalI および SphI で消化した PCR 増幅断片 (1.5 kb) を、pSTV28 (Takara Japan) の両制限酵素部位の間に挿入した。得られたプラスミド pSTV28BSPA を MluI および BglII で消化し、増幅 purA 遺伝子の内部配列 0.4 kb を除去して、クレノウ酵素で平滑末端化し、続いて、pDG646 (*Bacillus Genetic Stock Center*, Ohio) から切り出した *Staphylococcus aureus* のエリスロマイシン耐性遺伝子 (1.6 kb) の平滑末端化した断片に連結した。

#### 【0040】

得られたプラスミド pHSG398purA::erm を、上述のように Dubunau and Davidoff-Abelson の方法により調製された、KMBS4 のコンピテントセルの形質転換に使用した。エリスロマイシン耐性コロニーから個々に染色体 DNA を調製し、続いて上述の PCR により、ダブルクロスオーバー変異株をスクリーニングした。purA 欠損変異株 (purR::spc purA::erm) であると確認されたコロニーの 1 つを KMBS13 と命名した。予想通り、KMBS13 の細胞は、アデニン栄養要求株であった。

#### 【0041】

### 3) バチルス・ズブチリスの deoD 欠損変異株の構築

バチルス・ズブチリス由来の deoD 遺伝子の 5' 末端およびその上流領域を増幅するために、遺伝子データバンクの DNA 配列情報に従って合成したオリゴヌクレオチドプライマー No. 5 (配列番号 5) および No. 6 (配列番号 6) を用いて、94 で 30 秒、55 で 1 分、72 で 1 分の 30 サイクルで PCR を行った (Gene Amp PCR System Model 9600, Perkin Elmer)。プライマー No. 5 (29mer) は、deoD 遺伝子の開始コドンの上流の 310 番目 ~ 291 番目のヌクレオチド由来の配列、および 5' 末端に付加した EcoRI 部位を含む追加の 9mer 配列から構成される。プライマー No. 6 (29mer) は、5' 末端に BamHI 部位を含む追加の 9mer 配列を融合した deoD 遺伝子の開始コドンの下流の 39 ~ 57 のヌクレオチド由来の配列である。EcoRI および BamHI で消化した PCR 増幅断片 (0.4 kb) を、pSTV28 (Takara Japan) の両制限酵素部位の間に挿入して、pSTV28DON を創製した。

#### 【0042】

deoD 遺伝子の 3' 末端およびその下流領域を増幅するために、遺伝子データバンクの DNA 配列情報に従って合成したオリゴヌクレオチドプライマー No. 7 (配列番号 7) および No. 8 (配列番号 8) を用いて、94 で 30 秒、55 で 1 分、72 で 1 分の 30 サイクルで PCR を行った (Gene Amp PCR System Model 9600, Perkin Elmer)。プライマー No. 7 (29mer) は、deoD 遺伝子の終止コドンの下流の 321 番目 ~

302番目のヌクレオチド由来の配列、および5'末端に付加したHindIII部位を含む9mer配列から構成される。プライマーNo.8(29mer)は、5'末端にBamHI部位を含む追加の9mer配列を融合したdeoD遺伝子の終止コドンの上流の24番目~42番目のヌクレオチド由来の配列である。HindIIIおよびBamHIで消化したPCR増幅断片(0.4kb)を、pSTV28DONの両制限酵素部位の間に挿入して、pSTV28DONCを創出した。

#### 【0043】

ストレプトコッカス・フェカリス(Streptococcus faecalis)のカナマイシン耐性遺伝子を増幅するために、鋳型としてpDG783のプラスミドDNA(Bacillus Genetic Stock Center, Ohio)を、また遺伝子データベースのDNA配列情報に従って合成したオリゴヌクレオチドプライマーNo.9(配列番号9)およびNo.10(配列番号10)を用いて、94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の30サイクルでPCRを行った(Gene Amp PCR System Model 9600, Perkin Elmer)。プライマーNo.9(33mer)は、カナマイシン耐性遺伝子の開始コドンの上流の513番目~490番目のヌクレオチド由来の配列、および5'末端に付加したBamHI部位を含む追加の9mer配列から構成される。プライマーNo.10(33mer)は、5'末端にBamHI部位を含む追加の9mer配列を融合したカナマイシン耐性遺伝子の終止コドンの下流の117~140のヌクレオチド由来の配列である。BamHIで消化したPCR増幅断片(1.5kb)を、pSTV28DONCの唯一のBamHI部位に挿入した。得られたプラスミドpSTV28deoD::kanを、上述のようにDubunau and Davidoff-Abelsonの方法により調製した、KMBS13のコンピテントセルの形質転換に使用した。カナマイシン耐性コロニーから個々に染色体DNAを調製し、続いてプライマーNo.5およびNo.7を用いた上述のPCRにより、ダブルクロスオーバー変異株をスクリーニングした。deoD欠損変異株(purR::spc::erm deoD::kan)であると確認されたコロニーの1つをKMBS16と命名した。

#### 【0044】

##### 【実施例1】

バチルス・ズブチリス イノシン生産株のポリミキシン耐性変異株の選択および評価  
バチルス・ズブチリスKMBS16株の細胞(~10<sup>8</sup>)を、15、20、30または40mg/lのポリミキシンB硫酸塩(Sigma, USA)を含有するLプロス寒天培地(トリプトン-10g/l、酵母抽出物-5g/l、NaCl-0.5g/l、グルコース-2g/l、pH7、寒天20g/l)に植菌した。これらのプレートに34℃にて5日間インキュベートした。出現した自然変異株のコロニーから、バチルス・ズブチリスKMBS16pol<sup>R</sup>1-1株(VKPM B-8245)を選択した。

#### 【0045】

変異株および親株のポリミキシンおよびコリスチンに対する耐性(相対生育度)を、以下の手法により評価した。段階的な濃度のポリミキシンまたはコリスチンを添加することにより調製したLプロス5mlを入れた試験管に、あらかじめLプロス中で18時間振とうしながら生育させた試験株を約10<sup>6</sup>細胞/mlとなるように接種し、37℃で24時間振とう培養を行った。得られた培地を水で適当に希釈して、希釈物の540nmでの吸光度を測定して、生育度(ポリミキシンの場合にはPOD<sub>540</sub>、またコリスチンの場合にはCOD<sub>540</sub>)を調べた。抗生物質を含まないLプロスでの同一株の生育度(OD<sub>540</sub>)を100とした。ポリミキシン含有培地またはコリスチン含有培地における相対生育度は、それぞれ(POD<sub>540</sub>)/(OD<sub>540</sub>)×100、または(COD<sub>540</sub>)/(OD<sub>540</sub>)×100として算出することができる。結果を表1に示す。

#### 【0046】

##### 【表1】

表1

ポリミキシンB ( $\mu\text{g/ml}$ )	相対生育度、%		コリスチン ( $\mu\text{g/ml}$ )	相対生育度、%	
	KMBS16 pol <sup>R</sup> 1-1	KMBS16		KMBS16 pol <sup>R</sup> 1-1	KMBS16
0	100	100	0	100	100
5	100.5	80.3	5	102.3	93.6
7.5	95.9	40.9	7.5	96.0	34.7
10	92.1	28.6	10	93.5	13.8
12.5	37.9	0.2	12.5	73.0	13.7
15	11.3	0.1	15	7.5	0.6
17.5	0.4	0.0	20	0.6	0.0
20	0.0	0.0	25	0.0	0.0

## 【0047】

表1から、ポリミキシンB耐性として取得されたバチルス・ズブチリスKMBS16 pol<sup>R</sup>1-1株は、コリスチンにも耐性であることがわかる。

## 【0048】

バチルス・ズブチリスKMBS16 pol<sup>R</sup>1-1株および親株であるバチルス・ズブチリスKMBS16株を、それぞれLブロス中で34で18時間、通気しながら培養した。次に、得られた培養物0.3mlを、20×200mm試験管中の発酵培地3mlに接種し、ロータリーシェーカーを用いて34で72時間培養した。

## 【0049】

発酵培地の組成：(g/l)

グルコース	80.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.4
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.01
Mameno-TN	1.35
DL-メチオニン	0.3
NH <sub>4</sub> Cl	32.0
アデニン	0.1
トリプトファン	0.02
CaCO <sub>3</sub>	50.0

グルコースおよび硫酸マグネシウムは、別個に滅菌する。CaCO<sub>3</sub>は、180度で2時間、乾熱滅菌する。pHを7.0に調整する。

## 【0050】

培養後、培地中に蓄積したイノシン量をHPLCにより測定した。培地試料(500μl)を、15,000rpmで5分間遠心分離し、上清をH<sub>2</sub>Oで100倍希釈して、HPLCにより分析した。

## 【0051】

分析条件：

カラム：Luna C18(2) 250×3mm、5u(Phenomenex, USA)。

緩衝液：2% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH；0.8%(v/v)トリエチルアミン；0.55%(v/v)酢酸(氷酢酸)；pH4.5。

温度：30。

10

20

30

40

50

流速：0.3 ml / 分。

検出：UV 250 nm。

保持時間（分）：

キサントシン 13.7

イノシン 9.6

ヒポキサントシン 5.2

グアノシン 11.4

アデノシン 28.2

【0052】

結果を表2に示す。

【0053】

【表2】

10

表2

バチルス・ズブチリス菌株	OD <sub>540</sub>	イノシン、g/l
KMBS16	8.1	1.4
KMBS16 pol <sup>R</sup> 1-1	7.8	1.9

20

【0054】

表2に示すように、バチルス・ズブチリスKMBS16 pol<sup>R</sup>1-1株は、親株よりも多くイノシンを蓄積した。

【0055】

【実施例2】

バチルス・アミロリケファシエンス イノシン生産株のコリスチン耐性変異株の選択および評価

30

バチルス・アミロリケファシエンスAS115-7株の細胞（ $\sim 10^8$ ）を、10、15、20、30または40 mg/lのコリスチン硫酸塩（Sigma, USA）を含有する実施例1と同様のLプロス寒天培地に植菌した。これらのプレートを、34℃で5日間インキュベートした。出現した自然変異株のコロニーから、バチルス・アミロリケファシエンスC o 1<sup>R</sup>7-105株（VKPM B-8246）を選択した。

【0056】

この株及び親株のポリミキシンに対する耐性（相対生育度）を、実施例1に記載の方法により評価した。結果を表3に示す。

【0057】

【表3】

40

表3

ポリミキシンB ( $\mu\text{g/ml}$ )	相対生育度、%		コリスチン ( $\mu\text{g/ml}$ )	相対生育度、%	
	Col <sup>R</sup> 7-105	AS115-7		Col <sup>R</sup> 7-105	AS115-7
0	100	100	0	100	100
5	71.0	59.6	5	78.5	65.1
7.5	70.0	56.3	7.5	70.0	52.5
10	23.0	15.6	10	0.3	0.0
12.5	2.4	0.0	12.5	0.0	0.0
15	0.0	0.0	15	0.0	0.0

## 【0058】

表3からわかるように、コリスチン耐性株として得られたバチルス・アミロリケファシエンスCol<sup>R</sup>7-105株は、ポリミキシンBに対してより耐性である。

## 【0059】

バチルス・アミロリケファシエンスCol<sup>R</sup>7-105株および親株であるバチルス・アミロリケファシエンスAS115-7株を、それぞれLプロス中で、34℃で18時間培養した。次に、得られた培養物0.3mlを、20×200mm試験管に入れた、L-トリプトファンに代わりの40 $\mu\text{g/ml}$ のL-ヒスチジンおよび40 $\mu\text{g/ml}$ のL-チロシンを含有する実施例1の発酵培地3mlに接種し、ロータリーシェーカーを用いて34℃で72時間培養した。培養後、培地中に蓄積したイノシン量を、上記のようにしてHPLCにより測定した。結果を表4に示す。

## 【0060】

## 【表4】

表4

バチルス・ズブチリス菌株	OD <sub>540</sub>	イノシン、g/l
AS115-7	4.2	8.8
Col <sup>R</sup> 7-105	5.0	9.5

## 【0061】

表4に示すように、コリスチンに耐性のB.アミロリケファシエンスCol<sup>R</sup>7-105株は、親株よりも多くイノシンを蓄積した。

## 【0062】

## 【発明の効果】

本発明により、バチルス属に属する細菌によるイノシンおよびキサントシン等のプリンヌクレオシドの生産性を向上させることができる。また、本発明によれば、5'-イノシン酸、5'-キサントシル酸および5'-グアニル酸等のプリンヌクレオチドを効率よく製造することができる。

## 【0063】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Method for Producing Purine Nucleosides and Nucleotides

<130> P-B0606F

10

<140>

<141> 2003-02-06

<150> RU 2002103333

<151> 2002-02-11

<160> 10

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

ctcaagcttg aagttgcat gatcaaaa

28

40

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

10

<400> 2

ctcctgcaga catattgttg acgataat

28

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

ctcgtcgaca aaacgaatgg aagcgaacg

29

30

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

40

<400> 4  
ctcgcgatgca gaccaactta tatgctggct 29

<210> 5  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5  
ctcgaattcc agcggaaatattctttcccg 29  
20

<210> 6  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer 30

<400> 6  
ctcggatccc ggcaaaagca cagtatcc 28

<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA 40  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

ctcaagctta tggtttccag accatcgact 30

10

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

20

<400> 8

ctcggatccc atgatatgat agaagtgg 28

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

ctcggatccg aggtgatagg taagattata ccg 33

40

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

10

<400> 10

ctcgatccg gcgctcggga cccctatcta gcg

33

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 R 1/07 (2006.01) C 1 2 R 1:125  
 C 1 2 P 19/32 Z  
 C 1 2 R 1:07  
 C 1 2 P 19/40  
 C 1 2 R 1:125  
 C 1 2 P 19/40  
 C 1 2 R 1:07

- (72)発明者 ヴィタリ アルカディエヴィッチ リフシツ  
 ロシア連邦、113208、モスクワ市、スムスコイ通り5番地、1号棟、84号室
- (72)発明者 リュドミラ アナトリエヴナ カザリノヴァ  
 ロシア連邦、117321、モスクワ市、オストロヴィチャノヴァ通り16番地、4号棟、88号室
- (72)発明者 ニコライ ゲオルギエヴィッチ マトロソフ  
 ロシア連邦、113535、モスクワ市、ダロジュナヤ通り28番地、2号棟、1号室
- (72)発明者 エカチェリナ イゴレヴナ ムハノヴァ  
 ロシア連邦、113208、モスクワ市、チェルタノフスカヤ通り11番地、2号棟、179号室

審査官 中野 あい

- (56)参考文献 特開昭50-126885(JP,A)  
 特開昭55-162998(JP,A)  
 特開昭59-042895(JP,A)  
 Antimicrob. Agents Chemother., 1975年, vol. 8, no. 3, p. 366-369  
 Antibiot Khimioter., 1994年, vol. 39, p. 23-28  
 発酵と工業, 1983年, vol. 41, no, 10, p. 847-854

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21  
 C12P 19/32  
 C12P 19/40  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 PubMed