

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 19/40
//C12P19/40,C12R1:06,
1:11,1:38



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98117135.4

[45] 授权公告日 2003 年 7 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1114698C

[22] 申请日 1998.8.4 [21] 申请号 98117135.4
[30] 优先权
[32] 1997. 8. 4 [33] JP [31] 209133/1997
[71] 专利权人 有机合成药品工业株式会社
地址 日本东京
[72] 发明人 三上洋一 松本清一郎 吉中信二
须永阳之助 长谷川绫美
[56] 参考文献
CN107471A 1993.07.28 C12P19/40
EP0411158A 1991.02.06 C12N1/20
JP4197193A 1997.01.16 C12P19/38
审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 王达佐

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 1 页

[54] 发明名称 嘌呤核苷化合物的制备方法

[57] 摘要

本发明提供制备嘌呤核苷化合物的方法以及产生尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶的微生物，包括通过在含有磷酸离子的水溶液中使嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基在嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶的作用下进行碱基交换反应，生成的嘧啶碱基在微生物和由该微生物产生的酶的作用下转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶或者嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 嘌呤核苷化化合物的制备方法，其特征在于嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基在含有磷酸离子的水溶液中，通过嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶的作用进行碱基交换反应，生成的嘧啶碱基通过微生物或者由该微生物生成的酶的作用，转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物，其中所述的微生物是选自节杆菌属、芽胞杆菌属、假单胞菌属、红球菌属的一种微生物，由所述微生物生成的酶是尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶。

2. 权利要求 1 所述的嘌呤核苷化化合物的制备方法，其特征在于作为在碱基交换反应时生成的反应中间体的核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸的稳定剂是选自氨基乙酸、亚氨基乙酸、次氨基三乙酸、乙二胺四乙酸、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸以及它们的盐中的至少一种的化合物和硼酸或其盐。

3. 权利要求 1 或 2 所述的嘌呤核苷化化合物的制备方法，其中嘧啶核苷化合物是选自尿嘧啶核苷、脱氧尿嘧啶核苷、5-甲基尿嘧啶核苷以及脱氧胸腺嘧啶核苷的一种化合物。

4. 权利要求 1 或 2 所述的嘌呤核苷化化合物的制备方法，其中嘌呤碱基是选自腺嘌呤、鸟嘌呤、5-羟基嘌呤、卤化嘌呤以及氨基化嘌呤的一种化合物。

5. 权利要求 1 或 2 所述的嘌呤核苷化化合物的制备方法，其中微生物是节杆菌属 FERM BP-5907、巨大芽胞杆菌 FERM BP-5908、假单胞菌属 FERM BP-5909、红球菌属 JCM 3132 或者红球菌属 JCM 3191。

嘌呤核苷化化合物的制备方法

5 本发明涉及利用通过酶作用的核酸碱基的交换反应以高产率制备嘌呤核苷化化合物的方法，以及产生能用于该制备的酶的微生物。

10 一直以来，虽然提出了利用通过酶作用的核酸碱基的交换反应制备核苷化化合物的方法，但是原料体系和生成物体系之间形成反应的平衡状态，这就是无法提高产率的原因。作为解决方法，在特开平 4-197193 号公报中公开了使是核苷的肌苷或者 2'-脱氧肌苷(下面称为脱氧肌苷)和嘧啶碱基在磷酸盐水溶液中通过嘌呤核苷磷酸化酶(EC2.4.2.1)以及嘧啶核苷磷酸化酶(EC2.4.2.2)的作用进行碱基的交换反应，通过将该交换反应生成的次黄嘌呤通过黄嘌呤氧化酶的作用转变成尿酸，提高反应产率的方法。在这种情况下，由于尿酸不构成这些核苷磷酸化酶的底物，反应向生成嘧啶核苷的一方移动。

20 但是，该公报所公开的方法是原料采用肌苷或者脱氧肌苷以及嘧啶碱基，具有较好效率的制备嘧啶核苷的方法，但不是以价格更便宜更容易得到的嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基为原料制备嘌呤核苷化化合物的方法。在以嘧啶核苷化合物为原料的情况下，为了提高反应效率必须向反应体系中加入分解由碱基交换反应生成的嘧啶碱基的酶使平衡失衡，也可从天然物质在高活性状态下制备这种酶，离析的事例至今还没有报告。就是说，没有以嘧啶核苷化合物为原料的嘌呤核苷化化合物的高产率的制备方法。因此，迫切需要稳定的高产率的嘌呤核苷化化合物的制备方法。

30 本发明的发明者们应该解决上述问题，努力研究生产将在嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基进行交换反应时生成的嘧啶碱基转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物的酶的微生物，结果发现属于节杆菌属、杆菌属、假单胞属或者红球菌属的微生物可生产这种酶，从而完成本发明。

35 也就是说，本发明的第一个方面是高产率制备嘌呤核苷化化合物的方法，其特征在于在含有磷酸离子的水溶液中使嘧啶核苷化合物和嘌

呤碱基通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的作用进行碱基的交换反应中，生成的嘧啶碱基通过微生物或者由该微生物产生的酶转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物。

5 本发明的第二个方面是产生尿嘧啶胸腺脱氢酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶的微生物，它是选自节杆菌属 YGK 222(FERM BP-5907)、巨大芽胞杆菌 YGK 252(FERM BP-5908)以及假单胞细菌属 YGK 443(FERM BP-5909)的微生物。

10 通过利用本发明的核酸碱基的交换反应制备嘌呤核苷化合物的方法，可以以价格便宜且容易得到的嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基为原料，以高产率并且稳定地制备嘌呤核苷化合物。

15 图 1 表示在实施例 1 中在加入尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液的反应溶液中的各个成分的浓度随时间的变化图。

 图 2 表示在实施例 1 中在不加入尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液的反应溶液中的各个成分的浓度随时间的变化图。

 下面详细说明本发明。

20

 首先说明本发明的第一方面。

25 第一方面是嘌呤核苷化合物的制备方法，其特征在于在含有磷酸离子的水溶液中，在嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基通过嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶的作用进行碱基交换的反应中，生成的嘧啶碱基通过微生物或者由该微生物形成的酶的作用下，转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物。

 〈原料〉

30

 本发明的原料所采用的嘧啶核苷化合物如果受到嘧啶核苷磷酸化酶的作用，受到所使用生成的嘧啶碱基的分解酶的作用，对是否是天然型的或者非天然型的没有特别的限制。例如可以列举尿核苷、脱氧核苷、5-甲基核苷、脱氧胸腺嘧啶核苷，也可以包括其它非天然型的嘧啶核苷及非天然型的脱氧嘧啶核苷。

35

 本发明所采用的嘌呤碱基如果是受到嘌呤核苷磷酸化酶作用的，

没有特别的限定。例如可列举腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤等天然型嘌呤碱基，5-羟基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤等的氨基化嘌呤，2-氯嘌呤、6-氯嘌呤、2,6-二氯嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤等卤化嘌呤，以及6-巯基嘌呤、6-甲巯基嘌呤等硫化嘌呤等非天然型嘌呤碱基。

5

〈微生物以及酶〉

用于本发明的嘌呤核苷磷酸化酶、嘧啶核苷磷酸化酶原则上说任何来源的都可以。

10

对于在本发明中所采用的由分解嘧啶碱基的微生物产生的酶可以是将碱基交换反应生成的嘧啶碱基转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物的酶，对其没有特别的限制。例如可列举尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶(EC1.2.99.1)、二氢嘧啶脱氢酶(EC1.3.1.1)等。特别是由后面描述的本发明的微生物产生的酶，以及由红球菌属 JCM3132、或者红球菌属 JCM3191 产生的酶。

15

在本说明书中，通过微生物或者由微生物产生的酶是指采用含有微生物的悬浊液(菌体悬浊液)或者由这种微生物产生的酶进行嘧啶碱基的分解反应。因此，在本发明中，采用含有微生物的悬浊液(菌体悬浊液)或者由该微生物产生的酶可以进行嘧啶碱基的分解反应。也就是说，本发明可以直接采用含有微生物的菌体悬浊液来进行嘧啶碱基的分解反应，而且也可提取由微生物产生的酶进行该反应。

20

〈核糖-1-磷酸的稳定剂〉

25

在本发明中，通过嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶的作用形成的碱基的交换反应经过作为中间体的核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸的糖衍生物。这些中间体本来是不稳定的，如果放置，经过一段时间会分解成核糖或者脱氧核糖类的糖，但是如果反应体系中存在磷酸酶，更加速了中间体的水解反应。作为中间体的分解产物的核糖或者脱氧核糖类的糖不构成这些核苷磷酸化酶的底物，因此，减少了嘌呤核苷或者脱氧嘌呤核苷的生成量。在此，为了提高这些嘌呤核苷化合物的生成效率，在努力寻找使核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸类的糖衍生物稳定化，阻止磷酸酶活性的物质。其结果是发现结合一种形成络合物的化合物是有效的。

30

35

也就是说发现与选自氨基乙酸、亚氨基乙酸、次氨基三乙酸、乙

二胺四乙酸(简称 EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(简称 EGTA)以及它们的盐的至少一种以上的化合物和硼酸或者盐的结合是有效的。特别是硼酸和乙二胺四乙酸的结合具有显著效果。

5 〈反应条件和分离·精制〉

下面描述反应条件。在本发明中,原料嘧啶核苷化合物的初始浓度是 5~300mM,较好地是 10~50mM。嘌呤碱基一般是难溶性的,但是如果假定初始添加量全部溶解来计,初始浓度为 5~300mM,较好地是 10~50mM。磷酸离子的初始浓度为 1~20mM 就足够了。而且,核苷和嘌呤碱基通常采用相同的初始浓度。一般来说,相对于磷酸离子核苷的浓度比增大,目的产物的嘌呤核苷化合物的产率增大。

在作为稳定剂使用的形成配合物的化合物中,硼酸或者其盐的用量为 5~200mM,较好地是 50~100mM,结合的另一方面是 EDTA 或者其盐等的用量为 2~12mM,较好地是 4~6mM。

反应溶液的 pH 为 6.5~10.5,较好地是 7.0~8.0。反应温度为 35~60℃,较好地是 35~45℃。

20 从反应溶液中提取生成物可以使用结晶和色谱分离法等。

下面说明本发明制备方法的原理。

 〈本发明的原理和理论〉

25 (1)在本发明的第一个阶段,在磷酸离子存在情况下,通过嘧啶核苷磷酸化酶的作用,由嘧啶核苷化合物和磷酸离子生成嘧啶碱基和在如核糖-1-磷酸或者 2-脱氧核糖-1-磷酸这样的糖的 1 位上结合磷酸离子的糖衍生物(下面简单地称为糖衍生物)。

30 (2)下面,作为第二个阶段,生成的糖衍生物通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘌呤碱基的作用进行置换反应。由此,由糖衍生物和嘌呤碱基的反应生成嘌呤核苷化合物和磷酸离子。

35 整理(1)和(2)的反应,采用嘧啶核苷和嘌呤碱基,通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的作用,进行碱基的置换反应,生成嘧啶碱基和嘌呤核苷化合物。

(3)下面,在本发明中,反应体系含有将嘧啶碱基转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物的酶或者产生这些酶的微生物。在本发明中,可以采用尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶这样的酶或者产生这些酶的微生物,但是并不限于此。在本发明的制备方法中,通过上述酶或者产生这些酶的微生物和电子受体共存,嘧啶碱基被转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物。即,在反应体系中采用菌体悬浊液时,由于菌体内含有电子受体,反应体系中可不必加入电子受体。转变的嘧啶碱基由于不构成嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的底物,与底物的交换反应无关,从反应体系中排除。由此,反应的平衡向生成目的产物的嘌呤核苷化合物一侧移动,可高产率地得到目的产物。

(4)进而,根据需要,为了通过下面的优选方案进行具体地说明,也可含有进一步分解转变的化合物的酶。

下面,以具体的实施例说明本发明的制备方法。

本发明的优选方案原料嘧啶核苷化合物采用尿嘧啶核苷或者 2'-脱氧尿核苷(下面称为脱氧尿嘧啶核苷),核酸碱基采用嘌呤碱基,酶采用嘌呤核苷磷酸化酶、嘧啶核苷磷酸化酶以及尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶(EC1.2.99.1)。

(1)首先,在第一阶段,在磷酸离子存在情况下,通过嘧啶核苷磷酸化酶的作用,由尿嘧啶核苷或者脱氧嘧啶尿核苷和磷酸离子生成尿嘧啶和核糖-1-磷酸或者 2-脱氧核糖-1-磷酸(下面称为脱氧核糖-1-磷酸)。

(2)接着,在第二阶段,生成的核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘌呤碱基的作用进行置换反应。由此,由核糖-1-磷酸和嘌呤碱基的反应生成嘌呤核苷化合物和磷酸离子,由脱氧核糖-1-磷酸和嘌呤碱基的反应生成 2'-脱氧嘌呤核苷(下面称为脱氧嘌呤核苷)和磷酸离子。

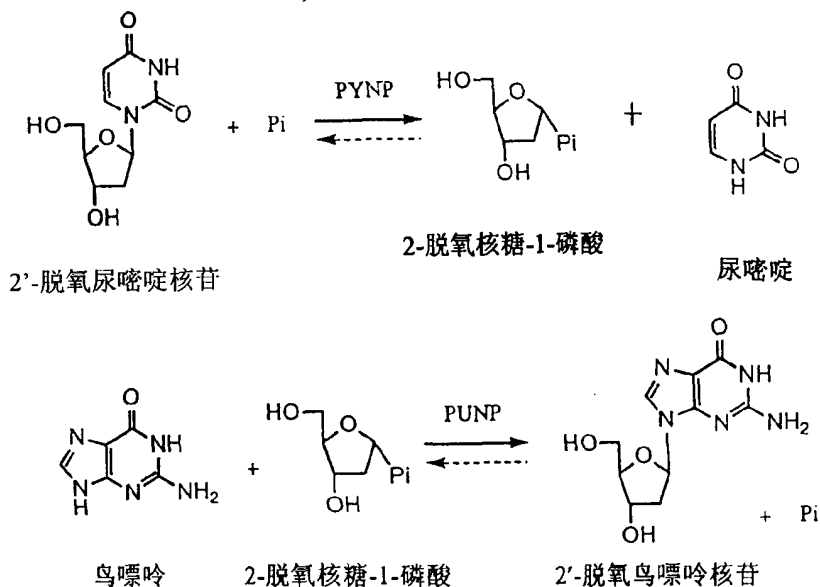
整理(1)和(2)的反应,采用尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷和嘌呤碱基,通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的作用,进行碱基

交换反应，生成尿嘧啶和嘌呤核苷或者脱氧嘌呤核苷。

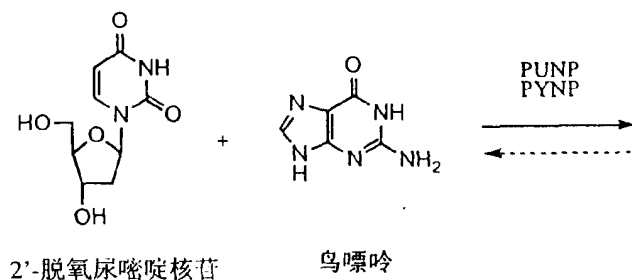
(3)通过在反应体系中尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶或者尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶和 NAD 等电子受体(氧化型)的共存，通过尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷的分解生成的尿嘧啶不可逆地生成巴比土酸。由于生成的巴比土酸不构成嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的底物，与底物的交换反应无关，排除在反应体系之外。由此，反应平衡向生成目的产物的嘌呤核苷化合物的一侧移动，以高产率地得到目的产物。

(4)进而，通过在反应体系中存在巴比土酶(バルビツラーゼ)(EC3.5.2.1)，巴比土酸分解成尿素和丙二酸。从而通过尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶促进了转换反应。

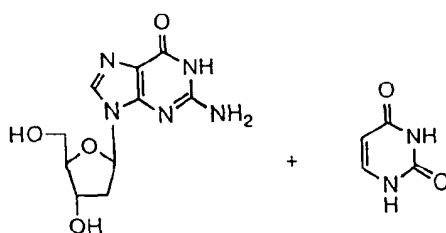
例如，初始原料的嘧啶核苷化合物采用脱氧尿嘧啶核苷，嘌呤碱基采用鸟嘌呤，作为目的产物的嘌呤核苷化合物得到 2'-脱氧鸟嘌呤核苷(下面称为脱氧鸟嘌呤核苷)的情况如下。



其中，PYNP 表示嘧啶核苷磷酸化酶，PUNP 表示嘌呤核苷磷酸化酶，Pi 表示磷酸。由(1)和(2)组成下面的式子。



5



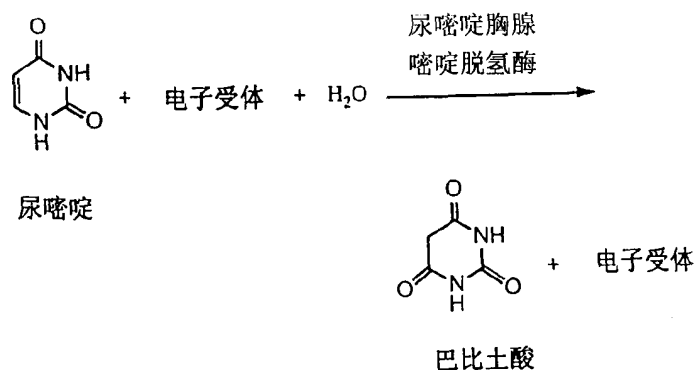
2'-脱氧鸟嘌呤核苷

尿嘧啶

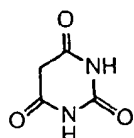
10

PYNPH 和 PUNP 如前面所定义。

15

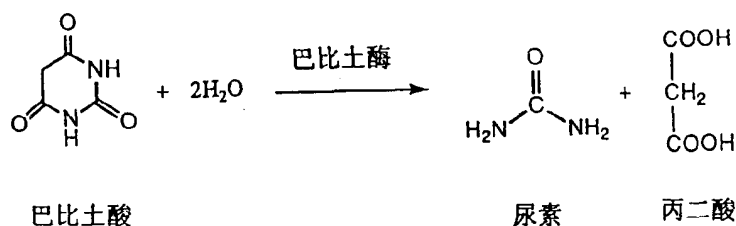


尿嘧啶



巴比土酸

20



巴比土酸

尿素

丙二酸

25

本发明其它的优选方案是嘧啶核苷化合物采用尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷，核酸碱基采用嘌呤碱基，酶采用嘌呤核苷磷酸化酶、嘧啶核苷磷酸化酶以及二氢尿嘧啶脱氢酶(EC1.3.1.1)。

30

(1)通过嘧啶核苷磷酸化酶的作用，由尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷和磷酸离子生成尿嘧啶和核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸。

35

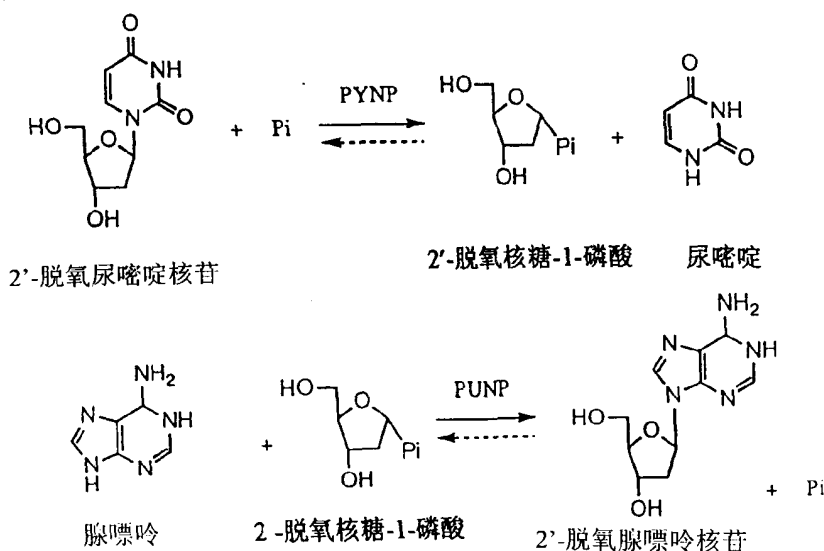
(2)接着，生成的核糖-1-磷酸或者脱氧核糖-1-磷酸通过嘌呤核苷磷酸化酶的作用和嘌呤碱基进行置换反应。由此，由核糖-1-磷酸和嘌呤碱基的反应生成嘌呤核苷化合物和磷酸离子，由脱氧核糖-1-磷酸和嘌呤碱基的反应生成脱氧嘌呤核苷和磷酸离子。

整理(1)和(2)的反应,采用尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷和嘌呤碱基,通过嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的作用,进行碱基的置换反应,生成嘌呤核苷或者脱氧嘌呤核苷和尿嘧啶。

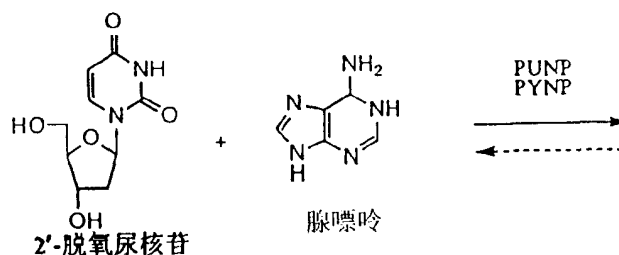
5 (3)通过在反应体系中的二氢尿嘧啶脱氢酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶和 NADH 等电子受体(还原型)共存,通过尿嘧啶核苷或者脱氧尿嘧啶核苷的分解生成的尿嘧啶不可逆地生成二氢尿嘧啶。由于生成的二氢尿嘧啶不构成嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的底物,与底物的交换反应无关,排除在反应体系之外。由此,反应的平衡向生成目的产物的嘌呤核苷化合物的一侧移动,定量得到目的产物。

10 (4)进而,通过在反应体系中存在二氢嘧啶酶(ピリミジナーゼ)(EC3.5.2.2),二氢尿嘧啶分解成 N-氨基甲酰-β-氨基丙酸。由此,促进了二氢尿嘧啶脱氢酶的反应。

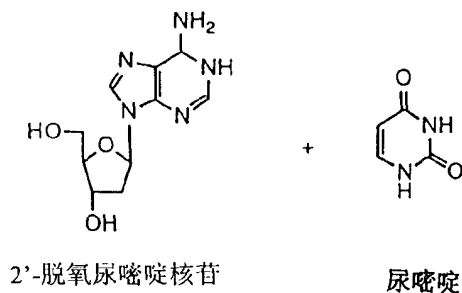
15 例如初始原料的嘧啶核苷化合物采用脱氧尿嘧啶核苷,嘌呤碱基采用腺嘌呤,得到目的产物为 2'-脱氧腺嘌呤核苷(下面称为腺嘌呤核苷)的情况如下。



30 其中, PYNP、PUNP 以及 Pi 如前面所定义。由(1)和(2)得到下面的式子。

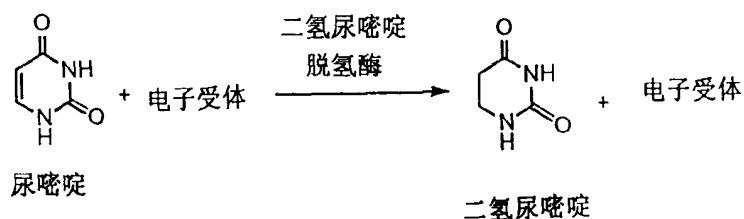


5

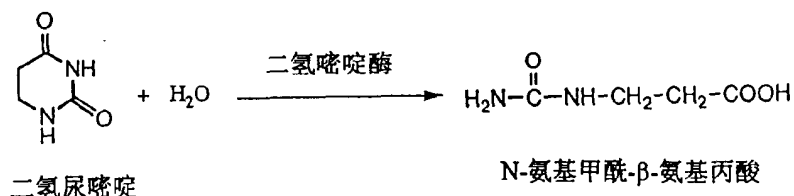


但是，PYNP 以及 PUNP 如前面所定义。

10



15



下面，说明第二个本发明的第二方面。

20

第二方面是产生尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶或者二氢尿嘧啶脱氢酶的微生物，它是选自节杆菌属 YGK 222(FERM BP-5907)、巨大芽胞杆菌 YGK 252(FERM BP-5908)以及假单胞细菌属 YGK 443(FERM BP-5909)的微生物。

25

〈生产酶的微生物以及其〉

本发明的发明者发现下面的微生物可生产使嘧啶碱基转变成不构成嘧啶核苷磷酸化酶以及嘌呤核苷磷酸化酶底物的化合物的一系列酶中的一种或者一种以上。

30

即，这些微生物可产生选自(1)尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶、(2)二氢尿嘧啶脱氢酶、(3)尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶和巴比土酶(EC3.5.2.1)以及(4)二氢尿嘧啶脱氢酶和二氢嘧啶酶(EC3.5.2.2)中至少一种的酶。

35

〈培养条件和酶的制备〉

这些微生物在普通的培养基上可良好地生长，生产这种酶，但是

在培养基上添加嘧啶碱基，能有效地提高酶的活性。

可以直接利用培养出的菌体作为粗菌体，也可以采用通过常规方法得到的粗酶。

5

节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)YGK 222(FERM BP-5907)

巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)YGK 252(FERM BP-5908)

假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)YGK 443(FERM BP-5909)

红球菌属(*Rhodococcus erythropolis*)JCM 3132

10

红球菌属(*Rhodococcus erythropolis*)JCM 3191

JCM 记号表示所提供的菌株是理化研究所微生物系统保存机构保存的菌株。这些菌株可以通过上述保存机构得到。其它菌株(YGK 222(FERM BP-5907)、YGK 252(FERM BP-5908)、YGK 443(FERM BP-5909))寄存在通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所特许微生物寄存中心。这些微生物、YGK 222(FERM BP-5907)、YGK 252(FERM BP-5908)以及 YGK 443(FERM BP-5909)的寄存是根据专利程序上的微生物寄存国际认定的布达佩斯条约在 1997 年 4 月 11 日进行的。这些菌株分别以括号内的寄存编号来寄存。

20

这些寄存菌株的菌学性质按照バ-ジエイヌ・マニユアル・オブ・デ
タ-ミナテイブ・バクテリオロジ-第 8 版(1975 年)、バ-ジエイヌ・マ
ニユアル・オブ・デタ-ミナテイブ・バクテリオロジ-第 1 卷(1984 年)
以及第 2 卷(1986 年)检测的结果如下。试验主要以长谷川武治编著的
改订版「鉴定微生物的分类系统」(学会出版中心, 1985 年)记载的方法进行。这些文献构成参考文献作为本说明书的一部分。

25

节杆菌属 YGK 222

1.形态的性质

30

(1)细胞的大小: 0.5~0.7×1.0~5.0 微米的杆菌

(2)革兰染色性: 阴性

(3)细胞的多形性: 发现在生活环境中伴随有球菌~杆菌的明显的多形性。

(4)运动性:

35

有(在酵母提取物加肉汁的液体培养基上培养 5~24 个小时可看见有运动性)

	(5)鞭毛的着生状态：有，1~2 个侧毛	
	(6)孢子的有无：无	
	(7)抗酸性：无	
5	2.培养的性质	
	(1)肉汁琼脂的平板培养：	
	在 30℃经过 24 小时的培养，形成乳白色半透明的表面呈不光滑的圆形的波纹状菌丛。	
	(2)肉汁琼脂的斜面培养	
10	在整个培养基上呈淡黄色半透明状扩展，发育良好。	
	(3)肉汁液体培养：	
	生长迟缓。加入了酵母提取物，在振动培养基上生长良好。	
	(4)肉汁明胶穿刺培养：表面液化。	
	(5)石蕊乳：不变化	
15	3.生理学的性质	
	(1)硝酸盐的还原	阴性
	(2)脱氮反应	阴性
	(3)MR 测试	阴性
20	(4)VP 测试	阴性
	(5)吲哚的生成	阴性
	(6)硫化氢的生成	阴性
	(7)柠檬酸的利用	
	• 克理斯蒂森培养基	阴性
25	• 克萨培养基	阴性
	(8)无机氮源的利用	
	• 硝酸盐	阳性
	• 铵盐	阴性
	(9)色素的生成	无
30	(10)尿素酶	阴性
	(11)氧化酶	阴性
	(12)过氧化氢酶	阴性
	(13)生长的范围	
	• pH 区域	5.5~9.5
35	• 温度区域	19~38℃
	(14)对氧的态度	需氧性

	(15)O-F 测试	
	• 葡萄糖	没有变化
	• 蔗糖	没有变化
	(16)各种碳源的利用	
5	• L-阿拉伯糖	±
	• D-木糖	+
	• D-葡萄糖	+
	• D-甘露糖	+
	• D-果糖	+
10	• D-半乳糖	+
	• 麦芽糖	+
	• 蔗糖	+
	• 乳糖	—
	• 海藻糖	+
15	• D-山梨醇	+
	• D-甘露醇	+
	• 肌醇	+
	• 甘油	—
	• 淀粉	—
20		
	4.GC 含量(HPLC 法测定)	
	G+C(摩尔%)=69.6	
	根据以上的菌学性质，判断本菌株属于节杆菌属(<i>Arthrobacter</i>	
	sp.)。	
25	巨大芽胞杆菌 YGK 252	
	1. 形态的性质	
	(1)细胞的大小：1.6×4.0~9.0 微米的杆菌	
	(2)革兰染色性：阳性	
30	(3)细胞的多形性：没有	
	(4)运动性：有	
	(5)鞭毛的着生状态：有，周毛	
	(6)孢子的有无：有，孢子囊不膨胀，孢子的形状为椭圆形	
	(7)抗酸性：无	
35		
	2. 培养的性质	

	(1)肉汁琼脂平板培养:	
	在 30℃经过 24 小时的培养, 形成乳白色半透明的表面呈不光滑的圆形波纹状菌丛。	
	(2)肉汁琼脂的斜面培养	
5	呈淡黄色半透明的表面呈树皮气味, 周边沿冲击呈锯齿状良好地生长。	
	(3)肉汁液体培养基:	
	生长迟缓。如果加入酵母提取物, 生长良好。	
	(4)肉汁明胶穿刺培养: 仅表面液化。	
10	(5)石蕊乳: 变成微酸性, 看见有凝固	
	3. 生理学的性质	
	(1)硝酸盐的还原	阳性
	(2)脱氮反应	阳性
15	(3)MR 测试	阳性
	(4)VP 测试	阴性
	(5)吲哚的生成	阴性
	(6)硫化氢的生成	阴性
	(7)柠檬酸的利用	
20	• 克理斯蒂森培养基	阳性
	• 克萨培养基	阳性
	(8)无机氮源的利用	
	• 硝酸盐	阳性
	• 铵盐	阳性
25	(9)色素的生成	没有
	(10)尿素酶	阳性
	(11)氧化酶	阳性
	(12)过氧化氢酶	阳性
	(13)生长的范围	
30	• pH 区域	5.5~10.5
	• 温度区域	10~43℃
	(14)对氧的态度	需氧性
	(15)O-F 测试	
	• 葡萄糖	没有变化
35	• 蔗糖	没有变化
	(16)各种碳源的利用	

	• L-阿拉伯糖	—
	• D-木糖	—
	• D-葡萄糖	—
	• D-甘露糖	—
5	• D-果糖	—
	• D-半乳糖	—
	• 麦芽糖	—
	• 蔗糖	—
	• 乳糖	—
10	• 海藻糖	—
	• D-山梨醇	—
	• D-甘露醇	—
	• 肌醇	—
	• 甘油	—
15	• 淀粉	+

4. GC 含量(HPLC 法测定)

$$G+C(\text{摩尔}\%)=34.7$$

根据以上的菌学性质，判断本菌株属于巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)。

假单胞菌属 YGK 443

1. 形态的性质

- (1)细胞的大小：0.4~0.6×0.6~2.4 微米的杆菌
- (2)革兰染色性：阴性
- (3)细胞的多形性：没有
- (4)运动性：有
- (5)鞭毛的着生状态：有，4~5 个极小的鞭毛
- (6)孢子的有无：无
- (7)抗酸性：阴性

2. 培养的性质

- (1)肉汁琼脂平板培养：
在 30℃ 经过 24 小时培养，形成乳白色半透明的表面呈光滑的圆形的波纹状菌丛。
- (2)肉汁琼脂的斜面培养

- 呈乳白色半透明的光泽，沿着冲击生长良好。
- (3)肉汁液体培养：
可见在振动培养基上良好地生长。
- (4)肉汁明胶穿刺培养：没有变化
- 5 (5)石蕊乳：碱性，不脓化。

3. 生理学的性质

- | | | |
|----|-------------|----------|
| | (1)硝酸盐的还原 | 阳性 |
| | (2)脱氮反应 | 阴性 |
| 10 | (3)MR 测试 | 阴性 |
| | (4)VP 测试 | 阴性 |
| | (5)吲哚的生成 | 阴性 |
| | (6)硫化氢的生成 | 阴性 |
| | (7)柠檬酸的利用 | |
| 15 | • 克理斯蒂森培养基 | 阳性 |
| | • 克萨培养基 | 阳性 |
| | (8)无机氮源的利用 | |
| | • 硝酸盐 | 阳性 |
| | • 铵盐 | 阳性 |
| 20 | (9)色素的生成 | 没有 |
| | (10)尿素酶 | 阳性 |
| | (11)氧化酶 | 阳性 |
| | (12)过氧化氢酶 | 阳性 |
| | (13)生长的范围 | |
| 25 | • pH 区域 | 4.2~10.5 |
| | • 温度区域 | 17~43℃ |
| | (14)对氧的态度 | 需氧性 |
| | (15)O-F 测试 | |
| | • 葡萄糖 | O(氧化的) |
| 30 | • 蔗糖 | 没有变化 |
| | (16)精酰胺的分解 | 阴性 |
| | (17)各种碳源的利用 | |
| | • L-阿拉伯糖 | + |
| | • D-木糖 | + |
| 35 | • D-葡萄糖 | + |
| | • D-甘露糖 | + |

5	• D-果糖	+
	• D-半乳糖	+
	• 麦芽糖	+
	• 蔗糖	+
	• 乳糖	—
	• 海藻糖	+
	• D-山梨醇	—
	• D-甘露醇	+
10	• 肌醇	+
	• 甘油	+
	• 淀粉	—

4. GC 含量(HPLC 法测定)

G+C(摩尔%)=62.3

15 根据以上的菌学性质，判断本菌株属于假单胞菌属(Pseudomonas sp.)。

实施例

下面通过制造例、试验例和实施例更详细地说明本发明。

20

制造例 1 制备含有嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的菌株悬浊液

25

按下面的顺序培养作为嘌呤核苷磷酸化酶(下面称为 PYNP)和嘧啶核苷磷酸化酶(下面称为 PYNP)的生产菌株的芽胞杆菌属脂肪嗜热杆菌(Bacillus stearothermophilus)JTS 859(FERM P-9666)。

30

细菌培养采用由バクトトリプトン 10 克、酵母浸汁 5 克、葡萄糖 3 克、食盐 3 克、肌苷 1 克以及水 1 升构成的 pH 为 6.2 的培养基。在 1.5 升这种培养基中加入 3×10^7 个芽胞杆菌属脂肪嗜热杆菌 JTS 859(FERM P-9666)的孢子，采用带有搅拌叶片(直径 70 毫米，上下各一只)的 3 升容积的发酵缸，以 500rpm 的速度旋转搅拌叶片，在通气量 1vvm，培养温度 65℃，pH6.0~6.4 条件下培养 5 个小时。

35

培养完成之后，通过离心分离菌体(10000G，4℃，15 分)进行收集，将得到的 20 克湿菌体在 30 毫升 10mM 的磷酸钾溶液(pH7)中形成

的悬浊液作为含有嘌呤核苷磷酸化酶和嘧啶核苷磷酸化酶的菌体的悬浊液(下面称为 PUNP • PYNP 酶溶液)。

制备例 2 制备具有尿嘧啶和胸腺嘧啶分解活性的菌体悬浊液

5 按照下面的顺序制备具有尿嘧啶以及胸腺嘧啶分解活性的节杆菌属 YGK222(FERM BP-5907)、巨大芽胞杆菌 YGK 252(FERM BP-5908)、假单胞菌属 YGK443(FERM BP-5909)、红球菌属 JCM 3132、红球菌属 JCM 3191 的菌体悬浊液。

10 细菌培养采用由尿嘧啶 2 克、磷酸二氢钾 1 克、磷酸氢二钾 3 克、酵母提取物 6 克以及水 1 升制成的 pH 为 7.0 的培养基。在加入了 500 毫升上述各培养基的 2 升容积的三角烧瓶中分别加入上述微生物的菌体或者 3×10^7 个孢子, 以 200rpm 的速度旋转, 在 35℃ 的温度下培养 15 个小时。

15

培养完成之后, 通过离心分离菌体(10000G, 4℃, 15 分)收集, 将得到的湿菌体在 6 毫升 10mM 磷酸钾溶液(pH7)中悬浮, 制成悬浊液(下面称为尿嘧啶 • 胸腺嘧啶分解酶溶液)。

20 实施例 1 由微生物生产尿嘧啶以及胸腺嘧啶分解酶

含有均为 0.05 毫升的 50mM 尿嘧啶或者 50mM 胸腺嘧啶中的任意一个、100mM 磷酸缓冲溶液(pH7)以及由制备例 2 制备的各个菌株得来的尿嘧啶 • 胸腺嘧啶分解酶溶液中任意一个的总量为 1 毫升的反应溶液, 在 35℃ 反应 15 分钟, 对反应溶液中的尿嘧啶以及胸腺嘧啶分解活性采用高速液体色谱分离法进行定量分析。结果列于表 1。

25

在此分解活性 U 是在 35℃ 每 1 分钟分解 1 微摩尔底物(尿嘧啶或者胸腺嘧啶)的酶活性的量。

表 1

菌株	分解活性(U/湿菌体 g)	
	尿嘧啶	胸腺嘧啶
节杆菌属 YGK222	36.4	14.5
巨大芽胞杆菌 YGK 252	5.8	2.1
假单胞菌属 YGK443	2.2	1.4
红球菌属 JCM 3132	10.6	4.2
红球菌属 JCM 3191	7.8	3.2

实验例 2 尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶生产菌的生产酶

使含有均为 0.05 毫升的 50mM 尿嘧啶、100mM 磷酸缓冲溶液(pH7)以及制备例 2 制备的由各菌株得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液中任意一个的总体为 1 毫升的反应溶液在 35℃反应 15~30 分钟。对反应溶液中的尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶、巴比土酶、二氢尿嘧啶脱氢酶以及二氢嘧啶酶的存在、巴比土酸以及二氢尿嘧啶的生成和消失通过高速液体色谱分离法追踪进行检测。其结果列于表 2。+表示检测有酶，-表示没有检测出酶。

在这种情况下，例如，如果二氢嘧啶酶的活性比二氢尿嘧啶脱氢酶的活性强，就检测不出生成物二氢尿嘧啶。但是，表 2 的-记号不表示该酶 100%的不存在。

表 2

菌株的编号	各种酶的检测			
	尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶	巴比土酶	二氢尿嘧啶脱氢酶	二氢嘧啶酶
YGK 222	+	+	-	-
YGK 443	+	+	+	+
YGK 252	+	+	+	+
JCM 3132	+	+	-	-
JCM 3191	+	+	-	-

实施例 1 通过 PUNP·PYNP 酶溶液和尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液的作用制备嘌呤核苷

使含有 20mM 脱氧胸腺嘧啶核苷、20mM 鸟嘌呤、1.25mM 磷酸

钾、制备例 1 制备的 PUNP·PYNP 酶溶液 2 毫升、制备例 2 制备的由节杆菌属 YGK 222 制备的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液 0.5 毫升、100mM 硼酸和 4mM 乙二胺四乙酸的总量为 100 毫升的水溶液(pH7)在 35℃ 反应 110 小时，测定反应溶液中所含的底物以及生成物的浓度。其结果如图 1 所示。

而且除了不加入尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液之外，全部与上述在同一个条件下进行反应，测定反应溶液中所含的底物和生成物的浓度。其结果如图 2 所示。

在图 1 和图 2 中，白色四角形表示脱氧胸腺嘧啶核苷，涂黑的菱形表示脱氧鸟嘌呤核苷，涂黑的三角形表示胸腺嘧啶，白色三角形表示 5-甲基巴比土酸。

在图 1 中，可见生成 5-甲基巴比土酸，进一步说明由于该酸分解消失，在这种尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液中至少有尿嘧啶胸腺嘧啶脱氢酶以及巴比土酶存在。在这种(图 1)情况下，可见稍有原料鸟嘌呤残存，脱氧胸腺嘧啶核苷基本上消失。生成 14.9mM(产率为 75%)脱氧鸟嘌呤核苷。与不存在尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液的情况(图 2)相比，可见目的产物的脱氧鸟嘌呤核苷的产量非常高。

实施例 2~11 采用各种原料核苷和各种原料嘌呤碱基制备嘌呤核苷

除了采用表 3 所示的嘧啶核苷化合物和嘌呤碱基之外，在与实施例 1 相同的条件下在 35℃ 反应 90 小时。在反应溶液中所含的底物和生成物的浓度的定量结果在表 3 表示。除了加入 0.5 毫升蒸馏水来代替尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液之外，在与上述相同的条件下进行反应来对照。通过加入尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液，提高了嘌呤核苷的产率，特别是其效果对鸟嘌呤核苷和脱氧鸟嘌呤核苷的生成有显著影响。

表 3

实 施 例	原料		生成的嘌呤核苷化合物	生成量(mM)	
				尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶	
	嘧啶核苷化合物	嘌呤碱基		存在时	不存在时
2	脱氧胸腺嘧啶核苷	腺嘌呤	脱氧腺嘌呤核苷	17.7	8.8
3	脱氧胸腺嘧啶核苷	次黄嘌呤	脱氧肌苷	16.4	12.4
4	脱氧胸腺嘧啶核苷	5-羟基嘌呤	5-羟基嘌呤脱氧核糖苷	17.7	15.7
5	脱氧尿嘧啶核苷	腺嘌呤	脱氧腺嘌呤核苷	16.6	8.8
6	脱氧尿嘧啶核苷	腺嘌呤	脱氧鸟嘌呤核苷	15.4	2.2
7	脱氧尿嘧啶核苷	次黄嘌呤	脱氧肌苷	15.9	11.7
8	脱氧尿嘧啶核苷	5-羟基嘌呤	5-羟基嘌呤脱氧核糖苷	17.2	13.9
9	尿嘧啶核苷	腺嘌呤	腺嘌呤核苷	12.9	3.7
10	尿嘧啶核苷	鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷	13.4	2.2
11	尿嘧啶核苷	5-羟基嘌呤	肌苷	16.2	11.2

实施例 12 由各菌株得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液对生成嘌呤核苷化合物的效果

5 制备含有 20mM 脱氧胸腺嘧啶核苷、20mM 鸟嘌呤、1.25mM 磷酸钾、制备例 1 制备的 PUNP·PYNP 2 毫升、制备例 2 制备的由各菌株得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液 0.5 毫升、100mM 硼酸和 4mM 乙二胺四乙酸的总量为 100 毫升的溶液(pH7)。除了加入 0.5 毫升蒸馏水来代替尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液之外，在与上述相同的条件下
10 反应进行对照。

将这些溶液在 35℃下反应 100 小时，测定反应溶液中所含的菌株和生成物的浓度。结果列于表 4。

15 可确定任何由菌株得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液都提高了脱氧鸟嘌呤核苷的生成效率。

表 4

菌株	脱氧鸟嘌呤核苷的生成量(mM)	
	尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液	
	存在时	不存在时
节杆菌属 YGK222	12.4	2.4
巨大芽胞杆菌 YGK 252	3.2	2.4
假单胞菌属 YGK443	2.7	2.4
红球菌属 JCM 3132	5.3	2.4
红球菌属 JCM 3191	4.6	2.4

实施例 13 反应中间体(核糖-1-磷酸)的稳定化和抑制磷酸酶的分解

使含有 5mM 核糖-1-磷酸、表 5 所示的稳定剂(EDTA 为 4mM, 其它以 100mM 的浓度使用)、制备例 1 制备的 PUNP·PYNP 酶溶液 0.02 毫升、制备例 2 制备的由节杆菌属 YGK222 得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液 0.01 毫升的总量为 1 毫升的水溶液(pH7)在 35℃反应 72 小时, 在反应溶液中所含的核糖-1-磷酸和分解生成物的核糖通过薄层色谱分离法测定的结果列于表 5。测定法是 Ishii 的方法(Agric. Biol. Chem., 53(12), 3209-3218(1989))。该文献作为参考文献是本说明书的一部分。除了加入三(羟甲基)氨基甲盐酸(下面称为“三”)100mM, 不加入两种酶溶液之外, 将与上相同制备的溶液作为“三”(对照)。表中的+表示核糖-1-磷酸分解, -表示不分解。

在不添加酶溶液的“三”(对照)中, 由于不进行到分解的程度, 可见酶溶液中含有磷酸酶。由于认为在硼酸和 EDTA 的添加溶液中核糖-1-磷酸不分解, 这些物质抑制了酶溶液中磷酸酶的活性, 可见赋予了核糖-1-磷酸具有稳定性。

表 5

稳定剂	核糖-1-磷酸的有无分解
三(对照)	+
三	+
硼酸	±
氨基乙酸	±
硼酸和氨基乙酸	±
硼酸和三	±
三和 EDTA	+
硼酸和 EDTA	-
氨基乙酸和 EDTA	±
EDTA	+

实施例 14 稳定剂对生成脱氧鸟嘌呤核苷的效果

5 使含有 20mM 脱氧胸腺嘧啶核苷、20mM 鸟嘌呤、表 6 所示的稳定剂(表中的*表示 4mM, 其它为 100mM 的浓度)、1.25mM 磷酸钾、制备例 1 制备的 PUNP·PYNP 酶溶液 2 毫升、制备例 2 制备的由节杆菌属 YGK222 得来的尿嘧啶·胸腺嘧啶分解酶溶液 0.05 毫升的总量为 100 毫升的水溶液(pH7)在 35℃反应 90 小时。在反应溶液中所含的脱氧鸟嘌呤核苷的浓度的定量结果列于表 6。

10

由这些结果可见, 与实施例 13 所示的硼酸和 EDTA 类似的配位体形成化合物的结合, 具有抑制核糖-1-磷酸的分解和稳定化的效果, 并且证明提高了嘌呤核苷化合物的生成效率。

表 6

稳定剂	脱氧鸟嘌呤核苷的生成量(mM)
三(对照)	0
硼酸	1.5
氨基乙酸	0
亚氨基二乙酸*	0
次氨基三乙酸*	0
EDTA*	0
EGTA*	0
三和 EDTA*	0
氨基乙酸和 EDTA*	0.4
硼酸和三	2.0
硼酸和亚氨基二乙酸*	4.7
硼酸和次氨基三乙酸*	4.9
硼酸和 EDTA*	11.6
硼酸和 EGTA*	12.7
	9.6

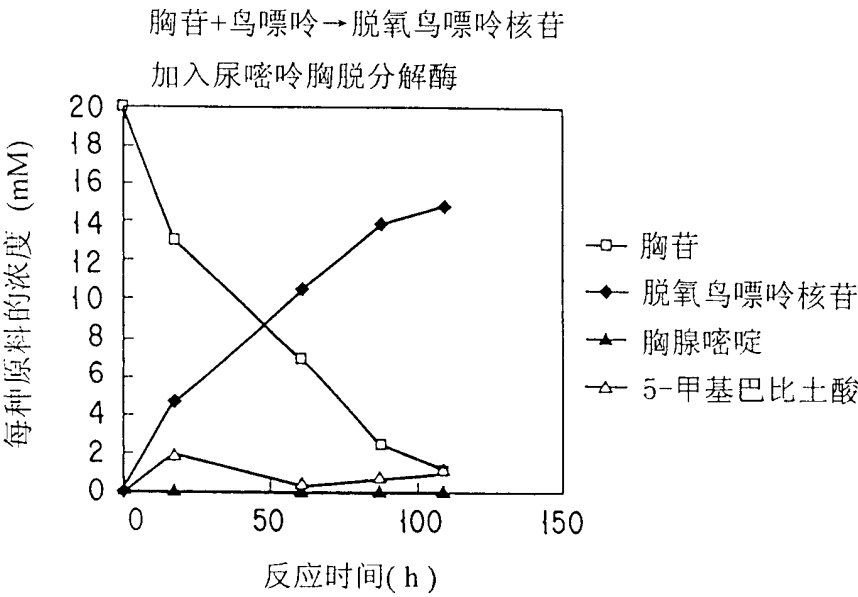


图 1

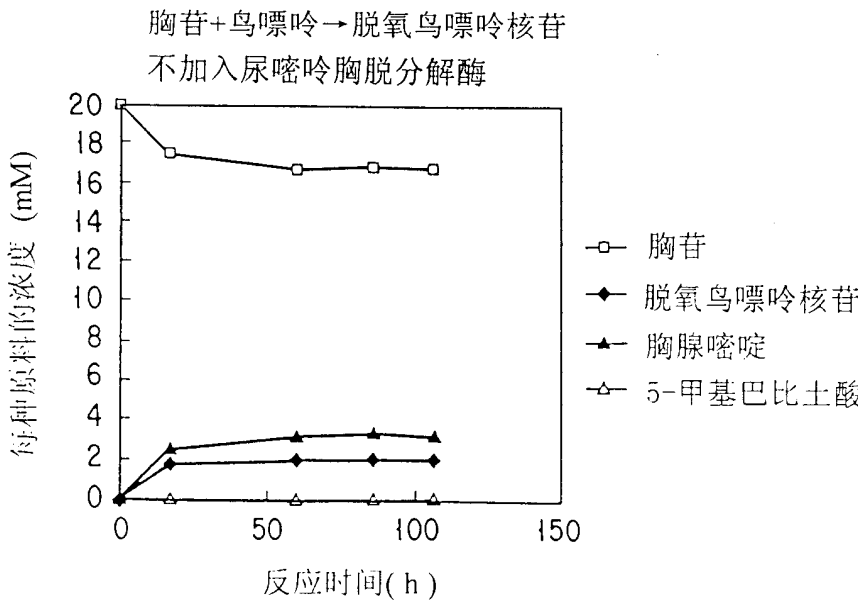


图 2