

農学博士山田秀明氏及び農学博士別府

輝彦氏の「微生物機能の開発とその利

用に関する基礎的研究」(共同研究)

に対する授賞審査要旨

微生物の産業的利用においては、自然界から新しい機能を持った微生物を見出すことによって数多くの独創的な物質生産技術が確立されてきており、種の多様性に基礎をおいた探索研究の重要性は現在改めて認識されつつある。一方で近年急速に発展した分子生物学的研究とその直接的成果の一つである組換えDNA技術によって、理論に基づく微生物機能の合理的設計の可能性が急速に現実化してきた。山田秀明氏と別府輝彦氏は、これらの互いに相補的な二つの研究手法の重要性に早くから着目して、相互に連携をとりながら先導的な研究を展開してきた。

#### I 微生物酵素を用いる生体触媒技術の開発に関する基礎的研究

山田氏は探索によって発見した数多くの新しい微生物酵素についてその反応機構を解明するとともに、それらを有機化学的手段と組

み合わせることによって数多くの独創的な生体触媒技術の基盤を確

立した。即ち、腸内細菌が有する $\beta$ チロシナーゼ、トリプトファナーゼ等のピリドキサル酵素が、それまでに知られていた分解反応のほか逆反応としての合成反応等を触媒する多機能酵素であることを見出してその反応機構を明らかにし、それを利用することによって生体に重要なアミノ酸である「チロシン」、「トリプトファン」を始めとして、パーキンソン氏病の治療薬となるL-DOPA等を簡単な基質からきわめて高率に合成する新しい酵素的方法を確立した。

一方、D,L-ヒダントイン誘導体を立体選択的に開環加水分解してD-アミノ酸を生成するヒダントイナーゼ活性を有する微生物を見出し、それを利用して半合成ベニシリンの合成原料等として重要なD型アミノ酸を特異的に合成する新しい酵素法を完成した。

山田氏はその他にも、糸状菌の一種から見出したアルドノラクトンをD立体選択的に加水分解する新しい酵素アルドノラクトナーゼを利用して、D,L-パントイルラクトンからD-パントテン酸を生産する新しいプロセスを提案するなど、各種のアミノ酸、ビタミン、補酵素、高度不飽和脂肪酸等の生理活性物質の酵素または微生物菌体を触媒とする合成法を確立し、その一連の成果は微生物利用技術の分野で世界的に生体触媒法が注目される主要な契機となっている。

#### II 有用酵素並びに二次代謝産物の生産に関する微生物の分子育

## 種に関する研究

別府氏は多数の有用酵素について遺伝子工学並びに蛋白質工学的研究を展開したが、特に子牛の胃から得られるアスパラギン酸プロテアーゼの一種で、チーズ製造に不可欠な凝乳酵素であるキモシンについて、cDNAのクローニング、大腸菌における大量発現、並びに生成蛋白の正しい巻き戻しに世界で最も早い時期に成功して、組換えDNA技術によるキモシンの生産に関して先駆的で重要な貢献をした。また、キモシンに代って用いられるケカビ由来の凝乳プロテアーゼについてもその遺伝子のクローニングと酵母を宿主とする効率的な分泌生産系を実現し、さらにこれらの発現系を利用した蛋白質工学的研究によってアスパラギン酸プロテアーゼにおける構造機能相関を説明するとともに、変異酵素による性質改良を実現した。

別府氏はまた、抗生物質生産菌として工業的に重要な放線菌について独自の分子遺伝学的研究を展開した。即ち、*Streptomyces griseus* におけるストレプトマイシン生産と胞子形成の開始に低分子自己調節物質の一種Aファクターが不可欠であり、その作用にAファクター特異的結合蛋白がレセプターとして関与していることを証明する一方、ストレプトマイシン合成及び胞子形成に関わる遺伝子群の中に存在するAファクター依存性転写開始領域の構造を確定、解明した。また、放線菌の二次代謝にこれまで真核生物のみ

認められていたセリン・スレオニン型を含む各種のプロテインキナーゼが関与していることを明らかにした。これら一連の成果によって、真核生物におけるホルモンとその信号伝達系に類似した制御機構が原核生物である放線菌で作用していることを初めて分子レベルで実証するとともに、二次代謝産物の生産性を改良する新しい分子育種の可能性を提示した。

## III ニトリルヒドラーゼの発見とその利用に関する研究

両氏の緊密な協力の成果の一端は、化学工業における基幹物質の一つであるアミドなどの新規な工業的製法の基盤に関わる共同研究に明示される。ニトリル基はこれまで生物学的親和性はきわめて乏しいと信じられていたが、山田氏は *Rhodococcus* を初めとする各種の細菌からニトリル基に加水してアミドを生成するニトリルヒドラーゼを発見し、鉄あるいはコバルトを含有するこの酵素による新しい水和反応の機構を提示した。本酵素の遺伝子のクローニングと関連遺伝子を含む遺伝子クラスターの解明は先ず別府氏によって行われ、引き続いて *Rhodococcus* における酵素生産に関する複雑な調節機構が明らかにされた。また *Rhodococcus* の宿主・ベクター系の開発によって本酵素の生産性並びに性質を改良する道が開かれた。これらの基礎的知見を基に、山田氏はアクリロニトリルからアクリルアミドの酵素的生産法の開発を行い、600g/l という常識を

越える高濃度で高収率のアクリルアミド生産を可能にした。これによって、酵素法を工業化学品の生産に適用する初めての実例が示された。

以上述べたように、山田氏と別府氏は微生物利用とその基礎に関わる広範な分野で協力して多くの先進的成果を上げるとともに、独創的な視点と新しい研究手法の積極的導入によってこの分野の研究を先導し、共同研究により顕著な成果を上げたものであり、これまでに国の内外で多数の賞を受賞するなど、その研究業績と活動は国際的に高く評価されている。

## 主要論文目録

- 1 微生物酵素を用いる生体触媒技術の開発に関する基礎的研究  
H. Yamada, H. Kumagai, N. Kashima, H. Torii, H. Enei and S. Okumura, Synthesis of L-tyrosine from pyruvate, ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 370-374 (1972).  
H. Kumagai, T. Ulagawa and H. Yamada, Studies on tyrosine phenol lyase: Modification of essential histidyl residues by diethylpyrocarbonate, J. Biol. Chem., 250, 1661-1667 (1975).  
T. Hirahara, S. Horinouchi and T. Beppu, Cloning, nucleotide sequence, and overexpression in *Escherichia coli* of the  $\beta$ -tyrosinase gene from an obligately symbiotic thermophile, *Symbiobacterium thermophilum*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 341-346 (1993).

- H. Yamada and H. Kumagai, Synthesis of L-tyrosine-related amino acids by  $\beta$ -tyrosinase, *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 19, ed. by D. Perlman, Academic Press, New York, pp. 249-288 (1975).  
S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Kii, H. Kumagai and H. Yamada, Microbial transformation of hydantoin to N-carbamyl-D-amino acids, J. Ferment. Technol., 57, 328-332 (1979).  
T. Ohashi, S. Takahashi, T. Nagamachi, K. Yoneda and H. Yamada, A new method for 5-(4-hydroxyphenyl) hydantoin synthesis, Agric. Biol. Chem., 45, 831-838 (1981).  
N. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yoshida and H. Yamada, Enzymatic preparation of L-tryptophan and 5-hydroxy-L-tryptophan, FEBS Lett., 25, 43-45 (1972).  
S. Shimizu, R. Komaki, Y. Tani and H. Yamada, A high yield method for the preparative synthesis of coenzyme A by combination of chemical and enzymic reactions, FEBS Lett., 151, 303-306 (1983).  
S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Oshiro and H. Yamada, High yield synthesis of S-adenosyl-homocysteine and related nucleosides by bacterial S-adenosylhomocysteine hydrolase, Agric. Biol. Chem., 48, 1383-1385 (1984).  
S. Shimizu, M. Katoh, K. Shimizu, M. Hirakata, K. Sakamoto and H. Yamada, Purification and characterization of a novel lactonohydrolase, catalyzing the hydrolysis of aldonate lactones and aromatic lactones, from *Fusarium oxysporum*, Eur. J. Biochem., 209, 383-390 (1992).  
H. Yamada and S. Shimizu, Synthesis of chiral intermediates for D-pantothenate production by microbial enzymes, Ann. NY Acad. Sci., 672, 374-386 (1992).

## II 有用酵素並びに二次代謝産物の生産に関する微生物の分子育種に関する研究

- K. Nishimori, Y. Kawaguchi, M. Hidaka, T. Uozumi and T. Beppu, Cloning in *Escherichia coli* of the structural gene of prorennin, the precursor of calf milk-clotting enzyme rennin, *J. Biochem.*, **90**, 901-904 (1981).
- K. Nishimori, Y. Kawaguchi, M. Hidaka, T. Uozumi and T. Beppu, Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*, *Gene*, **19**, 337-344 (1982).
- Y. Kawaguchi, N. Shimizu, K. Nishimori, T. Uozumi and T. Beppu, Renaturation and activation of calf prochymosin produced in an insoluble form in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **1**, 307-315 (1984).
- R. Hiramatsu, J. Aikawa, S. Horinouchi and T. Beppu, Secretion by yeast of the zymogen form of Mucor rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, and its conversion to the mature form, *J. Biol. Chem.*, **264**, 16862-16866 (1989).
- J. Suzuki, K. Sasaki, Y. Sasao, A. Hamu, H. Kawasaki, M. Nishiyama, S. Horinouchi and T. Beppu, Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, *Protein Eng.*, **2**, 563-569 (1989).
- O. Hara and T. Beppu, Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*—the role of A-factor, *J. Antibiot.*, **35**, 349-358 (1982).
- K. Miyake, S. Horinouchi, M. Yoshida, N. Chiba, K. Mori, N. Nogawa, N. Mori-kawa and T. Beppu, Detection and properties of A-factor-binding protein from *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, **171**, 4298-4302 (1989).
- K. Miyake, T. Kuzuyama, S. Horinouchi and T. Beppu, The A-factor-

binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation, *J. Bacteriol.*, **172**, 3003-3008 (1990).

D. Vujaklija, S. Horinouchi and T. Beppu, Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *afsR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, **175**, 2652-2661 (1993).

H. Onaka, N. Ando, T. Nihira, Y. Yamada, T. Beppu and S. Horinouchi, Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, **177**, 6083-6092 (1995).

K. Ueda, T. Uneyama, T. Beppu and S. Horinouchi, The aerial mycelium-defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3 (2), *Gene*, **169**, 91-95 (1996).

## III ニュートリトラーゼの発見と利用に関する研究

- Y. Asano, Y. Tani and H. Yamada, A new enzyme "nitrite hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251-2252 (1980).
- O. Ikehata, M. Nishiyama, S. Horinouchi and T. Beppu, Primary structure of nitrite hydratase deduced from the nucleotide sequence of a *Rhodococcus* species and its expression in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **181**, 563-570 (1989).
- T. Nagasawa, K. Takeuchi and H. Yamada, Characterization of a new cobalt-containing nitrite hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1, *Eur. J. Biochem.*, **196**, 581-589 (1991).
- M. Nishiyama, S. Horinouchi, M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada and T. Beppu, Cloning and characterization of genes responsible for

- metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *J. Bacteriol.*, 173, 2465-2472 (1991).
- M. Kobayashi, M. Nishiyama, T. Nagasawa, S. Horinouchi, T. Beppu and H. Yamada, Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1129, 23-33 (1991).
- Y. Hashimoto, M. Nishiyama, F. Yu, I. Watanabe, S. Horinouchi and T. Beppu, Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1003-1010 (1992).
- M. Kobayashi, H. Komeda, I. Nagasawa, M. Nishiyama, S. Horinouchi, T. Beppu, H. Yamada and S. Shimizu, Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Eur. J. Biochem.*, 217, 327-336 (1993).
- K. Kobayashi, H. Komeda, S. Shimizu, H. Yamada and T. Beppu, Characterization and distribution of IS1164 that exists in the high molecular mass nitrile hydratase gene cluster of the industrial microbe *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Proc. Japan Acad.*, 73, Ser. B, 104-108 (1997).

## 薬学博士野島庄七氏の「膜リン脂質の構造と代謝に関する研究——大腸菌ホスホリパーゼの研究を中心に——」に対する授賞審査要旨

リン脂質は生体膜の脂質二重層を構成する主要な脂質であり、生体膜の種類によりリン脂質の疎水性部および親水性部に、それぞれ特徴的な構造を有する。一般にリン脂質の疎水性部は各種脂肪酸エステル結合、また親水性部はリン酸ジエステル結合から構成されている。脂質二重層を構成するリン脂質は単なる不活性な構造体ではなく、生理活性物質の前駆体であると認識されている。リン脂質の各種エステルを分解する或る種のリン脂質加水分解酵素は細胞内、あるいは細胞間のシグナル伝達発現に関連していることが一九八〇年代より次第に明らかになってきている。

野島氏がリン脂質の生化学的研究を開始した一九五〇年代後半は、まだ生体膜二重層の概念は定着してはいなかったが、核酸と共にリン酸ジエステル構造を形成する生体主要成分として生命科学における機能については強い関心が持たれていた時代であった。野島氏