# 生物は超活性種をいかに活用するか: ビタミン B<sub>12</sub> 関与酵素とその活性維持システム

# 虎谷哲夫

遺伝子工学と構造生物学の時代を経て,酵素学もまたこれまでにない発展と深化を遂げている.今や,生体内に極微量しか存在しない酵素ですら立体構造とそれに基づく機能の 解析対象となり,酵素学は精密科学の段階に入った.ではこれからの酵素科学はどこへ向 かうのであろうか.筆者は,(1)酵素学の非経験的学問化と,(2)生物の知恵に学ぶシステ ム酵素学,が二つの重要な方向であると考えている.前者は,化学との融合の方向であ り,酵素の再設計や人工酵素の設計が可能な時代に突入するのに不可欠である.後者は生 物学との融合の方向であり,酵素をシステムとして理解することが新しい酵素応用技術や 医薬品の開発に重要である.本稿では、ビタミン B<sub>12</sub>関与酵素とその活性維持システムを 対象として,酵素研究の新しいパラダイムを求めた筆者らの研究を中心に紹介する.

# 1. はじめに

ヒトを含む生物の体内では、種々の超活性種が生成・消滅している. ラジカルはこの一つで、不対電子をもち反応 性が極めて高いため、組織障害、DNA 損傷、細胞死など を引き起こす.他方では、シグナル伝達や生体防御に重要 な役割を演じているラジカルもある.また、ある種の酵素 は化学的に困難な反応を触媒するのに、活性部位に生じた ラジカルや求核種、求電子種の高い反応性を制御しつつ活 用し、種々の代謝や光合成、DNA 修復などに関与してい る.例えば、ビタミン B<sub>12</sub> 関与酵素は、アデノシルコバラ ミン (AdoCbl)を補酵素とする酵素ではラジカル、メチ ルコバラミン (MeCbl)を補酵素とする酵素では最強の求 核反応剤とされる cob(I)alamin (B<sub>128</sub>)の高い反応性を触 媒に利用する.これら超活性種が副反応を起こして消滅す ると、酵素は不活性化される.これらの酵素は超活性種を いかにして制御しつつ利用し、化学的に困難な反応を触媒 するのであろうか.筆者は、その理解には生化学、構造生 物学、理論化学を基盤とした三位一体の研究が必要である と考える.さらに、これらは超活性種を含むがゆえに不活 性化を受け易いが、活性維持に関わるタンパク質(分子 シャペロン様再活性化因子や補酵素再生に関わる酵素群) がゲノムにコードされていることも明らかになりつつあ る.したがって、ヒトを含む生物は超活性種の副反応に よって起こるこれらの不活性化をすでに織り込み済みであ ると言える.本稿では、B<sub>12</sub>酵素本体とその活性維持シス テムに焦点を当て、生物の超活性種活用戦略について述べ る(以前の本誌総説<sup>10</sup>も参照されたい).

#### 2. B<sub>12</sub> 関与酵素の生化学

#### (1) **B**<sub>12</sub> 関与の酵素反応

ビタミン B<sub>12</sub> は生体内で AdoCbl または MeCbl に変換さ れて働く(図 1). これらはいずれも自然界に他に類例を みないコバルトー炭素(Co-C)シグマ結合を有する有機金 属化合物であるが,作用機構と代謝的役割は大きく異な る<sup>2,3)</sup>. すなわち,AdoCbl は図 2C の一般式で示される約 10 種類の分子内基転移反応(炭素骨格組換え<sup>47)</sup>, ヘテロ 原子脱離<sup>8-13)</sup>,分子内アミノ基転位<sup>14,15)</sup>およびリボヌクレオ

岡山大学大学院自然科学研究科(工学部生物機能工学科) (〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1)

How living organisms utilize super-active species: Vitamin  $B_{12}\mbox{-}dependent$  enzymes and their activity-maintaining systems

Tetsuo Toraya (Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700–8530, Japan)



図1 補酵素型 B<sub>12</sub> とアナログ

A. アデノシルコバラミン (AdoCbl). B. メチルコバラミン (MeCbl). C. シアノコバラミン (CN-Cbl). D. ヒドロキソコバラミン (OH-Cbl) またはアクアコバラミン (aqCbl). E. アデニニル アルキルコバラミン (n=2 のときアデニニルエチルコバラミン AdeEtCbl;n=5のときアデニニルペ ンチルコバラミン AdePeCbl). F. cob(II) alamin ( $B_{12x}$ ). G. cob(I) alamin ( $B_{12x}$ ). [Co] はコバラミン 部分を示す.



A. ジオールデヒドラターゼ (DD) 反応とグリセロールデヒドラターゼ (GD) 反応および DD の標識実験の 結果. B. エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) 反応と標識実験の結果. C. AdoCbl 関与転位反応の 一般式. D. AdoCbl の Co-C 結合開裂とアデノシルラジカルによって触媒される分子内基転移反応の最小機構. SH, 基質; PH, 生成物; S・, 基質ラジカル; P・, 生成物ラジカル; [Co], コバラミン部分; X, 転移基.

チド還元反応<sup>16,17</sup>に補酵素として関与する. AdoCbl の Co-C 結 合 は ホ モ リ シ ス し,生 じる ア デ ノ シ ル ラ ジ カ ル (Ado・)が触媒 ラジカルとなって反応は ラジカル機構(非 極性機構) で進行する.一方, MeCbl などメチルコリノ イドはメチオニン生合成<sup>18,19</sup>, 嫌気的酢酸生成<sup>20)</sup>, メタン 生成<sup>21)</sup>等のメチル基転移反応の補酵素として働く.これら

Α

Α



図3 酵素反応中(A, B)と不活性化後(C)のEPRスペクトル A. 非標識基質 1,2-propanediol(1); 1,1-dideuterated(2); 2-deuterated(3); 3,3,3-trideuterated(4); 1,1,2-trideuterated(5); 1,1,2,3,3,3-hexadeuterated(6). B. 非標識基質 1,2-propanediol(1); 1-<sup>13</sup>C-labeled(2); 2-<sup>13</sup>C-labeled(3). C. 非標識 AdoCblアナログ cob(II) inamide imidazolyl phosphate(上); [imidazole-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-labeled(下). 矢印は g=2.0.

の反応では Co-C 結合はヘテロリシスし,反応はイオン機構(極性機構)で進む.

AdoCbl 関与の酵素反応は、リボヌクレオチドレダク ターゼ反応以外は、基Xが隣接炭素上のHと交換する分 子内基転移反応であるという共通点がある(図 2C)<sup>4-17)</sup>. ジオールデヒドラターゼ(DD)での Abeles ら<sup>22-27)</sup>および Rétey ら<sup>28,29)</sup>による先駆的な標識実験の結果によれば(図 2 A),(1)基質の水酸基が2位から1位に立体特異的に移動 し、生じた1,1-ジオールが立体特異的に脱水され,(2)基 質の1位の水素が立体特異的に引き抜かれて補酵素の5<sup>-</sup>位 に移動した後,生成物の2位に立体特異的に返される.同様に,エタノールアミンアンモニアリアーゼ(EAL)では図2Bのように進む<sup>30-33)</sup>.しかし,隣接C-H結合が活性化されていないので,水酸基やアミノ基の1,2-シフトが起こるためには何らかの基質活性化が必要である.反応中の可視部吸収および電子常磁性共鳴(EPR)スペクトルでcob(II)alamin(B12)と有機ラジカルの生成が認められた(図3A,B)ことから<sup>34-40)</sup>,これらの酵素反応はラジカル機構で進行し,水素は水素原子(H・)として移動すると考えられる.

# (2) AdoCbl 関与転位反応の最小機構

こうして DD や EAL 反応の最小機構が確立され(図2 D), その後, すべての AdoCbl 関与転位反応に当てはまる ことが確認された<sup>2,3)</sup>. 基 X は基質の 2 位の置換基 (DD で は水酸基, EAL ではアミノ基),移動するHは1位の水素 に相当する。まず補酵素がアポ酵素に結合すると、その Co-C 結合が活性化され、基質がくると速やかにホモリシ スする (フリーの AdoCbl に比べて 10<sup>12±1</sup> 倍の加速) (山西, 山中, 虎谷, 未発表). 生じた Ado・が基質の1位水素を H・として引き抜き、基質ラジカルと5'-デオキシアデノ シン(AdoH)を生成する、基質ラジカルは基Xが2位か ら1位に移動(ラジカル転位)して生成物ラジカルとなっ た後、AdoHからH・を引き抜き返して生成物となり、 Ado・が再生される. Ado・は Buy と再結合して補酵素を 再生する.この最小機構の細部はほとんど不明であったの で、AdoCbl 関与酵素に共通する本質的な諸問題の解明に 取り組んだ.

#### (3) **B**<sub>12</sub> 補酵素の構造と機能

様々な補酵素アナログを合成し,DDやEALのアポ酵素を用いてそれらの補酵素機能を調べることで,AdoCbl という複雑な分子のどの部分がどのような役割を果たして いるかを推定できる.図4にまとめて示したように,コリ ン環40とアデニン環41.422は酵素との結合に,上方配位子の

リボース部<sup>43</sup>は歪みを Co-C 結合に伝達するのにそれぞれ 必要であり、総合するとこれらの部位は酵素との結合によ る Co-C 結合の活性化・開裂(触媒ラジカルの生成)に不 可欠であった<sup>10)</sup>.ホモ AdoCbl アナログでは AdoMeCbl の みが0.1~0.3%の活性を示した44.一方,下方配位子の リン酸部45は酵素との結合に、リボース部46,47)はスペー サーとして、5,6-ジメチルベンズイミダゾール (DBI) 部46-48)はそのかさ高さが触媒回転の継続的進行(ラジカル の制御)に重要であった.かさ高な塩基の配位により Co-C結合が不安定化されるという機構は否定された.なお. ヌクレオチド部塩基のコバルトへの配位が DD への結合に は不可欠だが、メチルマロニル CoA ムターゼ (MCM) へ の結合には必須ではないという事実49,500は謎であったが、 両酵素の立体構造解析の結果<sup>51,52)</sup>,前者が塩基配位(baseon)型,後者が塩基非配位(base-off)/His 配位(His-on) 型でコバラミンを結合することが判明し謎が解けた.

# (4) 速度論的同位体効果

基 X 移動と水素移動のどちらが律速過程であろうか. DD と EAL では、基質のデューテリウム置換体を用いた ときの速度論的同位体効果(KIE)(*k*<sub>H</sub>/*k*<sub>0</sub>)がそれぞれ約 10<sup>11,12,22)</sup>および 5<sup>53)</sup>と報告されており、C-H 結合の開裂が全 体反応の律速過程である.DD では、基質から補酵素、補 酵素から生成物へのトリチウム同位体効果がそれぞれ 20



図4 B<sub>12</sub>補酵素の構造と機能の関係

数多くの補酵素アナログを合成して, DD に対する補酵素機能を測定した結果をまとめた もの.

および 125 と報告されており<sup>27)</sup>,水素引き抜き返しの過程 が律速である.後者の値は特に大きく(k<sub>H</sub>/k<sub>D</sub> で 28 に相 当), EAL でも約 100 と報告された<sup>54)</sup>.したがって,トン ネル効果の関与が推定されているが,詳細な理由は明らか になっていない.

Ado・は1級炭素ラジカルで反応性が高く寿命が短いた め、どの酵素系においてもその生成が直接確認されたこと はない. B<sub>12</sub>の生成を指標として Co-C 結合のホモリシス (Ado・の生成)速度をストップトフロー法により測定す ると、デューテリウム置換基質を用いた場合に 3-4 程度の KIE が認められた(山西,表原,虎谷,未発表データ). したがって、Co-C 結合の開裂と Ado・による基質からの H・引き抜きは共役している.この共役は、立体構造から 見て直接的な協奏機構によるものではなく、速度論的共役 (kinetic coupling)であると考えられる.同様の共役は EAL など他の三つの AdoCbl 関与酵素でも報告されてい る<sup>53,55,50</sup>.

#### (5) EPR による反応中間体と B<sub>12</sub> 結合様式の解明

酵素反応中に生成するラジカル中間体の中で,定常状態 濃度の高いものは EPR により観察できる.<sup>2</sup>H や<sup>13</sup>C で標識 した基質を合成して EPR スペクトルを測定・解析し,DD 反応で観測される中間体は C1 上のラジカル(基質ラジカ ル)であると同定した(図 3A,B)<sup>57)</sup>. EAL 反応でも基質 ラジカルが EPR で観察されている<sup>58,59)</sup>. DD や EAL では, Co(II)と基質ラジカルから成るラジカルペアーが 9~12Å の距離で弱く交換相互作用および双極子相互作用している と説明され<sup>60,61)</sup>,グルタメートムターゼの場合と対比をな している<sup>620</sup>.

結合 B<sub>12</sub> を何らかの反応で B<sub>12</sub>に変換すると, EPR スペクトルから下方塩基配位子の Co(II)への配位の有無を調べることができる.<sup>15</sup>N 標識補酵素アナログを用いて不活

性化させた DD の EPR スペクトルでは,8本の微細(hyperfine;hf)分裂線がそれぞれ2本に超微細(superhyperfine;shf)分裂していた(図 3C)<sup>63,64)</sup>. これは Co(II)の不対電子が<sup>15</sup>N核(核スピン *I*=1/2)と相互作用していることを意味し,塩基 DBI がコバルトに配位した形(base-on型)で酵素に結合することを示した最初の例となった.グリセロールデヒドラターゼ(GD)や EAL も同様の結合様式を示したが<sup>65)</sup>,一方,DBI 部がコバルトから解離し,代わりに酵素のヒスチジン残基のイミダゾール基が配位した形(base-off/His-on型)で結合する B<sub>12</sub> 酵素もある<sup>66)</sup>. B<sub>12</sub> タンパク質にはコバラミン結合様式の異なる二つのスーパーファミリーがあり,これらは異なる祖先酵素に由来するという考え方が今では広く受け容れられている.

#### (6) **B**<sub>12</sub> 酵素の機構依存的不活性化

AdoCbl 関与酵素は、超活性種であるラジカルの高い反 応性を触媒に利用するため、反応性が高い反面、副反応に より不活性化され易い. 例えば、グリセロールはタンパク 質の安定化剤として用いられる不活性な化合物であるが, これを生理的基質とする DD や GD はそれぞれ平均約2万 回.約8万回の触媒回転後に機構依存的不活性化を受け る<sup>67-69)</sup>.この過程で、補酵素のCo-C 結合が不可逆的に開 裂して, AdoH とアルキルコバラミン様スペクトルを示す 化学種とを生じる.損傷コファクターは酵素に固く結合し たまま離れないため、酵素が不活性化されるのである. DD は 3-不飽和 1,2-ジオールやチオグリセロールによって も速やかな機構依存的不活性化を受けるので反応機構解明 に利用される<sup>70,71)</sup>. EALも生理的基質であるエタノールア ミンやそのアナログである 2-アミノ-1-プロパノールによ り機構依存的不活性化を受ける<sup>33,72)</sup>.これらの酵素は、基 質不在下でも Co-C 結合が活性化されているため、酸素分 子(O<sub>2</sub>)と反応して不活性化される<sup>69,72-74)</sup>.この過程で5-



図5 メチオニンシンターゼ (MS)の触媒サイクルと不活性化および再活性化 Fld,フラボドキシン (大腸菌);MSR,MSレダクターゼ (動物);AdoMet,S-アデノシルメチオニン;AdoHcy,S-アデノシルホモシステイン;H<sub>4</sub>-folate,テ トラヒドロ葉酸

ペルオキシアデノシンの中間的生成が最近報告された<sup>75)</sup>.

ある種の補酵素アナログを用いた場合は,本来不活性化 を引き起こさない基質によっても速やかな機構依存的不活 性化を受ける.上方配位子修飾アナログや<sup>41,42</sup>,かさ高で ない塩基を下方配位子にもつアナログ<sup>45-48,76)</sup>でこの傾向が 強く,塩基性の強さとは直接相関関係が見られなかった. よって,アデノシル基での適切な相互作用と下方配位子塩 基のかさ高さが酵素反応の継続的進行に重要であることが 示唆された.

一方,MeCbl 関与酵素は超活性種である B<sub>12</sub>。の高い反応 性を利用して化学的に困難な反応を触媒する.Co(I)を含 むコバラミンである B<sub>12</sub>。は最強の求核種とされるが<sup>77)</sup>,酸 化されて B<sub>12</sub>になり易い.例えば,B<sub>12</sub> 関与メチオニンシ ンターゼ (MS) は5-メチルテトラヒドロ葉酸からホモシ ステインへのメチル基転移によるメチオニン生成を触媒す る (図5)が<sup>18,19)</sup>,この酵素は平均約1,700回の触媒回転 後に酸化・不活性化される<sup>78)</sup>.強い還元剤存在下では, B<sub>12</sub>が B<sub>12</sub>。に再還元され,S-アデノシルメチオニン (AdoMet)による再メチル化を受けて触媒サイクルに戻る (再活性化)<sup>79)</sup>.このように,補酵素型 B<sub>12</sub>はAdoCbl も MeCbl も共に超活性種の発生剤ともいうべき存在で,そ れらが関与する酵素は宿命的に機構依存的不活性化を受け 易いと言えよう.

#### 3. 立体構造解析に基づく展開

# (1) 全体構造と B<sub>12</sub> 結合様式

立体構造に基づいて研究を進めるため、DD、GD、EAL の遺伝子クローン化<sup>80-82)</sup>と野生型あるいは改変型酵素の大 量発現・精製法を確立した<sup>82-84)</sup>. DDとシアノコバラミン (CN-Cbl)との複合体は姫路工業大学安岡教授グループ(当 時)との共同研究により1998年に<sup>52)</sup>(B<sub>12</sub>酵素の全立体構 造として2例目)、ついでGD<sup>84)</sup>、さらにEALは兵庫県立 大学樋口教授・柴田准教授グループとの共同研究により構 造解析した<sup>85)</sup>. 図 6A、B には最近解明した EAL の全体構 造とその1/6の構造を示す(DDの構造は文献<sup>52)</sup>参照). 全 体構造は異なるものの、いずれの酵素でも活性部位は  $\alpha$ サブユニットが形成する( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>(TIM)バレルの内部に あり(図 6C)、B<sub>12</sub>はサブユニット  $\alpha$ と $\beta$ の界面に base-on 型で結合していた. これは EPR 測定からの予測通りで、 これらの酵素が DxHxxG という base-off/His-on 型コバラ ミン結合モチーフをもたないこととも一致する<sup>66,80-82</sup>.

# (2) 基質結合部位の構造と金属イオンの同定

DD, EAL では基質は TIM バレルの内部, コリン環の上 部に結合していた(図 6C, D). 同様の構造は,報告され た他の AdoCbl 関与酵素にも共通して存在する<sup>51,86,87)</sup>. この ような構造による超活性種の空間的隔離が副反応防止に有 効なのであろう. DD, GDでは基質が二つの水酸基で直接金属イオンに 配位していた.この金属イオンは7配位で<sup>52,84</sup>,当初は必 須コファクター<sup>73,88</sup>であるK<sup>+</sup>と同定された.その後,DD とアデニニルペンチルコバラミン(AdePeCbl)との複合 体の構造解析の結果,これとは別の6配位金属イオンがア デニン環近傍に見出され,配位距離からK<sup>+</sup>と同定され た<sup>89)</sup>.最初に見出された基質結合金属イオンは,最近の生 化学実験により帰属を見直し,Ca<sup>2+</sup>と再同定した<sup>90)</sup>(経緯 については4(3)参照).したがって,DDはK<sup>+</sup>により活性 化されるカルシウムメタロエンザイムである<sup>90)</sup>.K<sup>+</sup>は配位 水を通してアデニン環と相互作用しており,その役割はア デニン部を支え,Co-C結合の活性化・開裂に貢献してい ると考えられる(Ca<sup>2+</sup>の役割は4(3)参照).

#### (3) アデニン部結合部位と結合 B<sub>12</sub>の構造

DDにはアデニン部結合部位がある<sup>91)</sup>.アデニニルエチ ルコバラミン(AdeEtCbl)(図1E)が補酵素活性をもたな いにも関わらず,酵素に結合するとCo-C結合が開裂した こと<sup>92)</sup>から,その重要性が示唆されたので,DDやEALと 不活性な補酵素アナログであるAdePeCbl<sup>41)</sup>(図1E)との複 合体の結晶構造を解析し,アデニン部結合部位を同定し た<sup>85,89)</sup>.アデニニルペンチル基は基質とコリン環の間に見 出され,アデニン部は遊離補酵素の場合<sup>93)</sup>と同じくコリン 環にほぼ平行であるが,反対側のエナンチオ面をコリン環 に向けていた(図6C,D).アデニン部と両酵素の間には 水素結合ネットワークが形成されており,DDでAdoCbl の構造と機能の関係の研究から推定した相互作用仮説図<sup>42)</sup> とよく一致する.このように,このポケットは酵素のアデ ノシル基に対する特異的認識の基礎になっている.

酵素に結合した B<sub>12</sub>のコリン環はほぼ平面であることか ら、かさ高な DBI の配位により Co-C 結合が開裂するとい うバタフライモデルは否定された. CN<sup>-</sup>の電子密度が見ら れないので、コバルトは X 線照射により Co(II)に還元さ れていると考えられる<sup>94)</sup>. Co-N (DBI) 距離は遊離 B<sub>12</sub> や MS 結合 B<sub>12</sub> に比べて 1~2 割長いことから<sup>52,84,85)</sup>, Co-N 距 離が遠くなると Co-C 結合のホモリシスが有利となり、ラ ジカル機構が促進されると考えられる<sup>65)</sup>. 酵素に結合した AdePeCbl の Co-N (DBI) 距離は遊離 AdoCbl と同程度な ので<sup>85,89)</sup>, DBI は Co-C 結合の開裂・再生に伴ってこの間 で振動しているのかもしれない.

#### (4) Co-C 結合の開裂とラジカルの基質への接近

アデニン部結合ポケットの構造に基づいて Co-C 結合開 裂の機構をモデリングにより推定できる<sup>85,89</sup>. 遊離 AdoCbl を,酵素に結合した AdePeCbl と B<sub>12</sub> 部分が重なるように 置くと,補酵素のアデニン部はその結合ポケットとそっぽ を向き (図 7A),重ね合わせることができない.しかし, ポケットに結合すると大きな結合エネルギーが得られるの で, Co-C 結合を切断してアデニン部を重ね,かつ Co-C 距離が最小になるようにモデリングすると、大きなひずみ が誘起されることが分かる(図7B).すなわち、AdoCbl が B<sub>12</sub> 部とアデニン部の両方で酵素に固く結合すると、必 然的に Co-C 結合は大きなひずみを受けて開裂せざるを得 ないと考えられる(立体ひずみモデル).基質は、DD で は休止状態のホロ酵素に比べてこのひずみを増大させ<sup>96)</sup>、 EAL では Eα287 の位置を固定して開裂後の状態を安定化 することで<sup>85)</sup>、Co-C 結合開裂のスイッチとして働く.コ リン環 C12 上の pro-S メチル基はアデニン部を下から支え ている<sup>11,85,89)</sup>.

Co-C 結合開裂直後の状態(図7B)では、Ado・のラジ カル中心 C5'は基質から遠く離れており、直接水素原子を 引き抜くことはできない、ラジカルと基質のこのような距 離問題は AdoCbl 関与酵素に共通する一般問題である. この問題も DD と EAL ではモデリングにより解決でき る<sup>85,89</sup>. リボース部は Co-C 結合の開裂により回転可能と なり、グリコシド結合の回りに回転して C5'が基質に大き く接近し、1 位の H・を引き抜くのに最適な位置にくる (リボース部回転モデル). EAL では、エーテル酸素と Eα287 がぶつかる直前の位置まで回転すると(図7C)、基 質ラジカルの1 位と補酵素の C5'が ESEEM 測定から示唆 された<sup>97)</sup>3. 2Åの距離にくる<sup>85)</sup>.

### (5) 中間体と水素引き抜き返しのモデリング

水素引き抜きの結果生じる基質ラジカルの基Xは、ラ ジカルのp軌道とC2-Xσ軌道とが重なることでエネル ギーが最小となるように2位へ同側移動し、生成物ラジカ ルを生じると考えられる.その結果、1位の立体配置は反 転すると予測されるが、実験データがまだない.

DDの場合,生成物ラジカルは Ca<sup>2+</sup>に配位したまま, AdoH のメチル基から H・を引き抜き返すと考えられるの で,O1-O2 軸の回りに回転し,C2-C5′距離が最小になるよ うにするとその距離は 2.6Åとなる<sup>89,98)</sup>. EAL でも,O1-N2 軸の回りに回転し,同様にモデリングすると C2-C5′距離 は 2.6Åとなる<sup>99)</sup>. いずれの酵素でも,この位置で 2 位が 水素引き抜き返しに最適の距離,方向にくるので,AdoH のメチル基から H・を引き抜き返して生成物となり, Ado・が再生すると考えられる.

# (6) アミノ酸残基の機能解析と精密触媒機構

変異型酵素を作成して酵素活性を測定した結果, DD で は Eα170, Dα335, Hα143 が触媒残基であり<sup>100,101</sup>, EAL では Eα287, Nα193, Dα362, Qα162, Rα160 が必須残基 であった(川口,森, 虎谷, 未発表). DD の Sα224A で は AdoCbl のアデニン環 N3 と水素結合できず, 活性が低 下し,機構依存的不活性化が高頻度に起こったことか ら<sup>102</sup>, アデニン部の配向維持の重要性がうかがえる.

活性部位残基の役割を考慮に入れた DD の精密触媒機構 を図8に示す<sup>90,98</sup> (EAL については文献<sup>85,99</sup>を参照).ホロ 酵素1では AdoCbl の Co-C 結合がある程度活性化されて いるが、まだほとんど開裂していない41)、基質が活性部位 に結合すると、Co-C 結合がさらに不安定化されてホモリ シスし、Ado・と B<sub>12</sub>が生成する(2). Ado・はリボース部 の回転によりラジカル中心C5'が基質に接近し(3),最寄 りの水素をH・として引き抜いて、基質ラジカルと AdoH を生成する(4). 基質ラジカルは Ado・よりも安定なので, Co-C 結合の開裂平衡は一気に開裂側にシフトする。基質 ラジカル4は、三員環遷移状態5を経由する協奏機構によ り、基X (DD では水酸基, EAL ではアミノ基) が2位か ら1位に移動して生成物ラジカル6となる。その際、基X と1位水酸基の酵素との水素結合が維持されたまま炭素骨 格が回転し、今度は生成物ラジカル6のラジカル中心C2 がAdoHの5'メチル基に近付き、H・を引き抜き返して生 成物と Ado・を生じる(7). 生成物7は脱水(EAL では脱 アンモニア)されてアルデヒド8となり、水分子により置 換されて活性部位から離脱する. Ado・は B12 と再結合し て AdoCbl を再生する(1). Co-C 結合の再生により結合エ ネルギーが放出され反応が完結する.

# (7) 立体化学経路

酵素は一般にキラルな基質に対して立体特異的であり, 片方のエナンチオマーにのみ作用する.しかし,DDや EAL は例外的で両方のエナンチオマーに作用する(図 2A, B)<sup>22,28,29,103)</sup>.この謎を解くため,各エナンチオマーが結合 した DD および EAL の立体構造を解析した<sup>98,99)</sup>.両酵素と もモデリングにより Ado・の位置が推定できるので,ラジ カル中心が各エナンチオマーの最寄りの水素を引き抜くと 考えれば,実験で見られた水素引き抜きの特異性はすべて 説明できた.

生じる基質ラジカルは2位の置換基Xがエネルギー的 に有利な同側移動をして生成物ラジカルに転位する.3(4) で記したように、生成物ラジカルが水素結合を維持したま まで AdoH のメチル基からH・を引き抜けるようにモデリ ングすると、水素引き抜き返し過程の立体化学経路が予測 できる.DD では活性部位はどちらのエナンチオマーから のラジカル中間体も許容するが<sup>98)</sup>,EAL では活性部位残基 との立体反発により(S)体基質からの生成物ラジカルは許 容されず、メチレンラジカルの回転後に水素引き抜き返し が起こる<sup>99)</sup>.すなわち、両酵素とも立体非特異的なわけで はなく、各エナンチオマーはそれぞれ立体特異的に反応す るのである.

#### (8) 機構依存的不活性化抵抗性酵素への改変

合理的デザインによる DD の分子工学的改変を試みた. DD は生理的基質の一つであるグリセロールにより機構依 存的不活性化を受ける.グリセロール分子はキラルではな いが,酵素の活性部位はキラルなので,酵素は二つの"結 合コンホメーション"を区別する. Bachovchin らは水素 引き抜き部位に pro-S-CH<sub>2</sub>OH がくる結合コンホメーショ ンを G<sub>s</sub>,他方を G<sub>R</sub> と定義し,G<sub>s</sub>型で結合したグリセ ロールが主に不活性化に寄与すると報告した<sup>68)</sup>.筆者らは G<sub>s</sub>,G<sub>R</sub> がそれぞれ(S)体,(R)体の1,2-プロパンジオール が結合したコンホメーションに対応し,DDと GDの活性 部位がそれぞれ(S)体,(R)体基質に高い親和性を示すこ とが両酵素のグリセロールによる不活性化への感受性と対 応していることを見出した<sup>104)</sup>.DDのグリセロール複合体 のX線解析の結果,グリセロールは確かにG<sub>s</sub>型で結合 し,3位水酸基はDDのSα301と水素結合していた. Sα301A 変異により酵素は(R)体1,2-プロパンジオールへ の親和性が上昇し,グリセロールによる不活性化に抵抗性 を示すようになった<sup>104)</sup>.

# 4. 理論化学との連携に基づく展開

# (1) ラジカル触媒機構の理論化学的検証

B<sub>12</sub>関与酵素のラジカル反応機構はエネルギー論的に妥 当であろうか.九州大学吉澤教授グループとの共同研究に より DD 反応について理論化学的に検証した.基質,エチ ルラジカル,金属イオン等 27 原子から成る小さなモデル を用いた高精度の密度汎関数 (DFT)法計算では<sup>105-107)</sup>,水 素引き抜き,水酸基移動,水素引き抜き返しの3過程に遷 移状態 (TS1~3)が存在し,活性化エネルギーはエネル ギー的に十分起こり得る大きさであった.しかし,この計 算では律速過程が水酸基移動となり,実験結果と合わな かった.Radom らも2位水酸基の部分的プロトン化,1位 水酸基の部分的脱プロトン化の重要性を示唆した<sup>108)</sup>.

全酵素モデルを用いた高精度計算は計算機能力から困難 なので、基質、Ado・のリボース部、基質結合金属イオン および七つのアミノ酸残基から成る活性部位をQM領域 としてDFT法による量子力学(高精度)計算を行い、そ れ以外はMM領域として分子力学(低精度)計算を行っ た(RM/MM法)<sup>109,100</sup>. その結果、上記3過程に遷移状態 が存在し、活性化エネルギーはTS3>TS2>TS1の順と なった(図9)ことから、活性部位残基の寄与により水酸 基移動の遷移状態(TS2)が安定化されると考えられる. TS2はEα170による1位水酸基の脱プロトン化で5.6 kcal/mol、Hα143と2位水酸基の水素結合で1.6 kcal/mol 安定化されると見積もられた.

# (2) 計算化学的変異導入による機能解析

計算化学ではモデルに摂動を与えて計算し,その効果を 見積もることが容易に行える.活性部位アミノ酸残基に変 異を導入した場合の効果を非経験的に予測し,変異型酵素 からの実測値と比べてみた(図10)<sup>111)</sup>. Eα170A では Eα221 が Eα170 の働きを代替するため,TS2 のエネルギーは野 生型より少し高い程度であるが,配向変化のため AdoH か らの水素引き抜き返しのエネルギー障壁(TS3)が高くなっ た.全反応における律速過程は野生型では水素の引き抜き 返しである<sup>106,10-111</sup>. Hα143A では TS2 のエネルギーが高く なって TS3 のそれに近付くので,水素引き抜き返しが部 分律速となる実験事実<sup>101</sup>をよく説明できる.Eα170Q や Eα170A も水素引き抜き返しが律速,Eα170A/Eα221A で は水酸基移動が律速となり,活性化エネルギーから予測さ れる相対活性は図 10 の赤柱のようになる.これらの変異 型酵素を実際に調製して実測した相対活性はピンク柱の通 りであり,予測値と実測値がかなりよく一致していた<sup>111</sup>. このことは計算化学的変異導入による活性部位アミノ酸残 基の非経験的機能解析が有効であり,実験することなく半 定量的に行える可能性を示している.

#### (3) DD の基質結合金属イオンの再同定と役割

DD の基質結合金属イオンは当初 K<sup>+</sup>と帰属されたもの の,配位距離が K<sup>+</sup>としては短く,むしろ Ca<sup>2+</sup>に近い値を 示した<sup>52)</sup>.また,K<sup>+</sup>を常磁性 Tl<sup>+</sup>で置換しても基質ラジカ ルとの相互作用が EPR, ENDOR, ESEEM で認められな いという疑問が出された<sup>112)</sup>.この金属イオンを K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>とした場合の基質とアミノ酸残基との結合距離 を QM/MM 計算で最適化した結果,Ca<sup>2+</sup>としたときに X 線構造と最もよく一致した<sup>113)</sup>.

そこで,DDの基質結合金属イオンの生化学的再同定を 行った<sup>90)</sup>.アポ酵素は基質不在下でEDTAにより強く阻害 され,基質存在下では保護された.原子吸光分析により酵 素1モルあたり約2グラム原子のカルシウムが検出され た.EDTA処理後,限外濾過することによりカルシウム除 去酵素が得られ,これにCa<sup>2+</sup>を添加すると酵素活性が回 復したことから,本酵素はK<sup>+</sup>依存性カルシウムメタロエ ンザイムであると結論した.Ca<sup>2+</sup>はK<sup>+</sup>よりも電荷が大き い分ルイス酸性が強いので,基質の水酸基の配位により水 酸基移動(ラジカル転位)を促進する可能性が考えられる. 最近の吉澤教授グループの計算で,Ca<sup>2+</sup>はK<sup>+</sup>に比べて水 酸基移動の遷移状態を約10 kcal/mol 安定化するという結 果が得られており<sup>100</sup>,Ca<sup>2+</sup>のこの働きが裏付けられた.

# (4) ラジカル酵素触媒の原理

AdoCbl 関与酵素の精密触媒機構を拡張して、ラジカル 酵素<sup>17,114)</sup>の触媒原理を考えてみる.これらの反応は酸塩基 機構的に活性化されていない基質への反応で、温和な条件 下では非酵素的にほとんど起こらない ( $k_e/k_n \sim \infty$ ). その 理解には新しい機構概念が必要であり、筆者は酵素的ラジ カル触媒という非極性機構を提唱してきた<sup>11,95)</sup>.

AdoCbl 関与酵素反応のように,H・引き抜きによって 隣接位の結合が活性化される反応が典型例である(図11). 触媒ラジカルがない場合,この反応は熱力学的には起こり 得るが,活性化エネルギーが高すぎて速度論的には起こり 難いと仮定する.活性部位に触媒ラジカル(R・)が導入 されると,このラジカルのH・引き抜きによる安定化と共 役して基質が基質ラジカルになり、基質活性化が容易に達成される.基質ラジカルになるとエネルギー的に遷移状態に近付き、活性化エネルギーが小さくなるので反応が加速されるわけである.このような反応では、R・による水素引き抜き、基質ラジカルから生成物ラジカルへの転位、生成物ラジカルによる水素引き抜き返し、の3過程に遷移状態が存在するので、ポテンシャルエネルギー変化は図11のようになる<sup>11,95)</sup>.これは理論計算からも裏付けられた(図9).この触媒原理の本質は遷移状態の高い山を複数の低い山に分割して越え易くすることにあり、この点で共有結合触媒と共通しているが、より大きな活性化エネルギーを要する反応でも触媒し得る.

# 5. B<sub>12</sub>酵素の再活性化タンパク質

#### (1) B<sub>12</sub> 酵素の代謝的役割と機構依存的不活性化

ラジカル酵素はラジカルが消滅して不活性化された場合 に、いかにして修復・再活性化されるのであろうか. AdoCbl 関与酵素は生理的基質によっても機構依存的不活 性化を受ける場合がある.典型例がグリセロールで、これ は DD や GD に対してよい基質であると同時に、強力な不 活性化剤としても挙動する<sup>67-69</sup>. EAL も生理的基質である エタノールアミンやそのホモログである 2-アミノプロパ ノールにより不活性化される<sup>33,72)</sup>. これらの不活性化は、 ラジカル中間体が副反応により消滅することで AdoCbl が 再生されず、生じた損傷コファクターが酵素から離れない ために起こる<sup>111</sup>.しかし、グリセロールは DD、GD を産 生する細菌の増殖基質、またエタノールアミンはこの培地 の唯一の窒素源であり、かつ、これらの酵素はそれらの基 質の代謝に不可欠の役割を果たしている(図 12A、B)の で<sup>11,115-117</sup>,その不活性化は生理的にも大きな謎であった.

# (2) **B**<sub>12</sub> 酵素の再活性化因子の発見

生体内ではこれらの不活性化が起こらないか、あるいは 起こるとしても速やかに再活性化されるのではないかと考 えた. トルエン処理により細胞膜の透過障壁をなくした菌 体(in situ の系)内でも不活性化は起こるが,不活性化さ れた DD や GD のホロ酵素は ATP 依存的に速やかに再活 性化されることを見出した118,119. この再活性化にはタンパ ク質因子が関与し, K. oxytoca の DD 遺伝子 (pddABC) の 3'-隣接領域の二つの ORF をその遺伝子 (*ddrAB*) と同定 した<sup>120)</sup>. pddABCと ddrAB はそれぞれ pdu オペロンの *pduCDE*, *pduGH* に対応する (図 12C)<sup>121)</sup>. 大腸菌で高発 現させた DdrA( $\alpha$ ), DdrB( $\beta$ )は  $\alpha_2\beta_2$  複合体として共精製 され、グリセロールにより不活性化されたホロ DD を AdoCbl, ATP, Mg<sup>2+</sup>存在下で再活性化したので,これを ジオールデヒドラターゼ再活性化因子(DD-R)と名付け た<sup>120,122,123)</sup>. DDのホロ酵素は、基質不在下ではO<sub>2</sub>によっ ても不活性化されるが、O2 不活性化ホロ酵素も同条件下 で DD-R により再活性化される.

ホモロジー検索によれば、*dha* オペロンの GD 遺伝子 (*gldABC*)(*dhaBCE* に対応)近傍にコードされる DhaF と OrfW がそれぞれ DdrA と DdrB に高いホモロジーを示 し<sup>124)</sup>, また, *eut* オペロンの EAL 遺伝子(*eutBC*)上流に コードされる EutA が DdrA と高いホモロジーを示す<sup>125)</sup>. これらの組換え体タンパク質はそれぞれ不活性化された GD および EAL の再活性化因子として働くことが確認で きたので, DD-R にならってそれぞれ GD-R, EAL-R と名 付けた<sup>124-126)</sup>. 再活性化因子の存在は, AdoCbl 関与酵素が ラジカル機構で触媒するが故に不活性化され易いことを考 えると, 理に適っている.

#### (3) **B**<sub>12</sub> 酵素の再活性化因子の機能

DD-R と GD-R の機能を図 13A にまとめた<sup>122,123,126)</sup>.ホロ 酵素は、グリセロールを基質とする酵素反応中に、補酵素 の Co-C 結合が不可逆的に開裂し、生じた損傷コファク ターが酵素に固く結合しているため酵素は不活性化され る. DD-R や GD-R は ATP 依存的に損傷コファクターを解 離させ、生じるアポ酵素に未損傷補酵素が結合して活性な ホロ酵素が再生される.これが再活性化の仕組みである. 再活性化因子によって酵素から解離するのは、上方配位子 にアデニン部をもたない B<sub>12</sub> 類に限られ、AdoCbl が酵素 から放出されることはない.

再活性化の分子機構を図 13B に示した<sup>123,126</sup>. ADP 結合型 DD-R (GD-R) は酵素に対する高親和性型で,不活性 化されたホロ酵素に結合して損傷コファクターを放出させる. 生じるアポ酵素と DD-R (GD-R) の複合体は補酵素 を結合できず不活性であるが, ATP 存在下でヌクレオチ ド交換が起こる. ATP 結合型 DD-R (GD-R) は酵素に対 する低親和性型なのでアポ酵素から解離する. アポ酵素は AdoCbl と結合して活性なホロ酵素を再生し,一方, ATP 結合型 DDR (GD-R) は結合 ATP が加水分解されて ADP 結合型に戻る. DD-R は触媒的に働き,複数の不活性化ホ ロ酵素分子を再活性化できるので, "reactivase" とも呼ぶ べき 1種の酵素である<sup>127</sup>.

#### (4) 再活性化因子は分子シャペロン

DD-R, GD-R は酵素と一時的に複合体を形成するが, 最終的には系の構成成分とならないので,分子シャペロン の1種と考えられる<sup>123,126,127</sup>. 微弱な APPase 活性(37℃で  $k_{cat} = 1.4 \text{ min}^{-1}$ )もこのことを示唆する.三つの再活性化 因子と大腸菌 DnaK やヒト HSP70などのヒートショック タンパク質 70(HSP70)ファミリーの分子シャペロンと の間には,アミノ酸配列に全体的なホモロジーはないもの の,局所的にホモロジーの高い領域が 3箇所ある.これら を HSP70の ATPase ドメインの立体構造にマッピングする と, ADP 結合領域の三つのループに対応していた.この ことから,再活性化因子と HSP70ファミリー分子シャペ





図9 DDの全酵素モデルを用いた QM/MM 法による理論計算

TS1,基質からの水素引き抜きにおける遷移状態.TS2,基質ラジカルからの水酸基移動(ラジカル転位) における遷移状態.TS3,5'-デオキシアデノシンからの水素引き抜き返しにおける遷移状態.



図10 DDへの計算化学的変異導入による活性部位アミノ酸残基の機能解析 水色柱と青色柱はエネルギー障壁の高さ,青色柱は律速過程となるエネルギー障壁を示す. 赤色柱は律速過程のエネルギー障壁から求めた酵素活性の予測値. ピンク色柱は実際に変異 型酵素を調製して測定した酵素活性の実測値を示す.



図11 酵素的ラジカル触媒の原理

A. 触媒ラジカルがない場合. B. 触媒ラジカルがある場合. SH, 基 質; PH, 生成物; R・, 触媒ラジカル. S<sup>\*</sup>, 遷移状態. エネルギー障 壁の高さは任意に作図. Α

PPP, <

adenosyltransferase

В

AdoCbl

E Cbl

ADP **RF** 

ATP····Cbl<sup>II</sup>≺·······X-Cbl Cbl reductase(s)

Product

Inactivation

E

RF

E-AdoCbl

ADP

P,

reactivating ATP

Substrate

AdoCbl +

F

ATP

ADP RF

factor

E

AdoH(

Cbl()

P<sub>i</sub>



Inactivation

,AdoCbl

Е

ATP **RF** 

ADP

E·X-Cbl·AdoH

図13 AdoCbl 関与酵素の活性維持システムと再活性化因子の作用機 構

A. 不活性化されたホロ酵素のコバラミン交換機構による再活性化と 補酵素リサイクルの必要性. B. DD-R, GD-R の作用機構. E, アポ 酵素; RF, 再活性化因子. X-Cbl, 損傷コファクター; AdoH, 5'デ オキシアデノシン.



図 14 ADP 結合型 DD-R の立体構造と DD β サブユニットとの構造類似性

A. 全体構造(αβ)<sub>2</sub>. B. αβ ヘテロダイマーのドメイン構造. C. DD-R の β サブユニットと DD の β サブユ ニットとのフォールド類似性. 赤字はサブユニット界面の Mg<sup>2+</sup>に配位する Glu 残基を示す. MOLSCRIPT と RASTER3D により作成.



図 15 DD-R の立体構造に基づく損傷コファクター解離の分子機構

A. サブユニットスワッピングによる DD・DD-R 複合体の生成. B. DD・DD-R 複合体のドッキングモデルの構築. DD α, 黄土 色; DD β, 緑色; DD γ, 青. DD-R のカラーコードは図 14B に同じ. 赤矢印は立体反発を示す. C. DD の α サブユニットと β サ ブユニットの界面に存在する 5×15Å程度の隙間. B と C はそれぞれ MOLSCRIPT と CHIMERA により作成.



図 16 動物細胞と大腸菌の細胞内 B<sub>12</sub> 輸送・代謝システムの類似性 A. 動物細胞. B. 大腸菌. AdoMet, S-アデノシルメチオニン; MSR, MS レダクターゼ; Fld, フラ ボドキシン.



A. 1,2-ジオールおよびエタノールアミンの代謝における DD と EAL の役割. B. グリセロールの代謝におけ る GD の役割. GD の役割は DD によって代替できる. C. *pdu* オペロン. 1,2-プロパンジオール資化に必要な 酵素や BMC 構築に必要なタンパク質がコードされている.

ロンとの間でヌクレオチド結合様式が保存されており,共通のスイッチ機構をもつことが示唆された<sup>123,126</sup>.

# (5) 再活性化タンパク質の立体構造解析

ADP 結合型 DD-R の X 線解析により得られた全体構造 とその半分のドメイン構造を図 14A, B に示す<sup>128)</sup>. α サブ ユニットは四つのドメインから成り, ATPase ドメインは 予想通り HSP70 と同様のフォールドをもっていた. DD-R のβサブユニットでは, 三つの連続した Glu 残基の真ん 中の Eβ31 がサブユニット界面の Mg<sup>2+</sup>に配位しており, 周辺も含めてその領域のアミノ酸配列が DD のβサブユ ニットにも保存されている (図 14C). この部位に変異を 導入すると DD-R の機能が失われた (大林, 細川, 森, 虎 谷, 未発表) ので, 両者が類似したフォールドをもつこと が機能発現に重要であると考えられる.

#### (6) サブユニットスワッピング

フォールドの類似性から、DD-Rの $\beta$ サブユニットが DDの $\beta$ サブユニットにより置換されるというサブユニッ トスワッピングの可能性が示唆されたので、ADP存在下 でDDとDD-Rの複合体を生成させ、native PAGEで分離 後、そのバンドを切り出して SDS-PAGE することにより サブユニット組成を解析した<sup>127)</sup>.その結果,まず初めに両 者の1:1複合体が生じ,次いで1:2複合体が生成するこ とが分かった(図15A).その組成と,複合体形成に伴っ てDD-Rのβサブユニットが放出された事実から,サブユ ニットスワッピングが実証された.

# (7) 損傷コファクター解離の分子機構

DD-RのβサブユニットにDDのβサブユニットを重ね 合わせると、両者の複合体のドッキングモデルを構築でき る (図 15B)<sup>128)</sup>. この複合体において、双頭の赤矢印で示 した箇所でDDとDD-Rのαサブユニット同士の間に大き な立体反発が誘起される. これにより、DDのαサブユ ニットがβサブユニットに対して傾く結果、界面に結合 している損傷コファクターが酵素から解離すると考えられ る. では、損傷補酵素が活性部位から抜け出てくる隙間は あるだろうか. DDや EALのαとβサブユニットの間に はもともと高さ5×15Å程度の隙間がある (図 15C)<sup>85,127</sup>. 酵素が DD-R に結合し、αサブユニットがβサブユニット に対して傾くことでさらに 6Å程度動くとすれば、アデニ ン部を失った損傷コファクターが丁度抜け出てくる程度の 隙間ができるのではないかと想像される. なお、ADP 結 合型か ATP 結合型かで酵素との親和性が大きく変化する "ヌクレオチドスイッチ"の分子機構は未解明である.

#### 6. B<sub>12</sub>酵素の活性維持システムと一般性

#### (1) 細菌 AdoCbl 関与酵素の活性維持システム

再活性化因子の機能は固く結合した損傷コファクターを 酵素から解離させることにある. では, 系中の AdoCbl が すべて損傷を受けたらどうなるか. アポ酵素が生じても補 酵素がなければ活性なホロ酵素ができず、反応は停止して しまう.酵素から解離した損傷コファクターを酵素の外側 で還元的に再アデノシル化して補酵素を再生しなければ、 物質収支は成り立たないのである. すなわち, コバラミン レダクターゼとアデノシルトランスフェラーゼという補酵 素再生系の二つの酵素を含めて、初めて AdoCbl が細胞内 でリサイクルし,完全な活性維持システムが成り立つ(図 13A). 細菌のpduオペロン (図12C) には, DD, DD-R と共に、PduS コバラミンレダクターゼと PduO アデノシ ルトランスフェラーゼもコードされており121,細菌が AdoCbl 関与酵素の機構依存的不活性化を織り込み済みで, 活性維持システムを備えていることが分かる. これらのシ ステム構成タンパク質間でどのような相互作用があり、ど のように効率的にシステムが動作しているかについては今 後の課題である.

最近,他グループによりDD,DD-R,PduO,PduSが細菌の微小区画(bacterial microcompartment;BMC)または メタボロソームと呼ばれる多角体オルガネラに存在するこ とが明らかにされ<sup>129)</sup>,そこへの局在化機構に興味がもたれ る.筆者らは,DDの低溶解性がβおよびγサブユニット のN末端側の短い配列により決定されることを見出 し<sup>130,131)</sup>,BMCへの局在化との関連を考察したが,このこ との実験的証拠がBobik らにより最近報告された<sup>132)</sup>.

# (2) ヒト AdoCbl 関与酵素の活性維持システム

ヒトを含む哺乳類にも B<sub>12</sub>酵素の活性維持システムは存 在するであろうか.ヒトでは B<sub>12</sub>代謝システムの機能不全 は代謝異常を引き起こし、病気の原因となるので、この問 題は特に重要である.B<sub>12</sub>酵素の活性低下による代謝異常 症患者の遺伝子変異は八つの相補群に分けられている<sup>133</sup>. これらの cbl 遺伝子 産物の機能で既知のものを挙げると (図 16A),B<sub>12</sub>はトランスコバラミン(TCII)との複合体 として細胞表面の受容体から取り込まれ、リソソームに移 行する.細胞質に放出されたB<sub>12</sub>は、そのコバルト原子が 2価に還元された後、細胞質の酵素であるアポ MS(cblG 遺伝子産物)と結合してホロ酵素となり、ホモシステイン のメチル化(メチオニン合成)に関与する.一方、ミトコ ンドリアに取り込まれた還元型 B<sub>12</sub>はアデノシル化された 後、アポ MCM(mut遺伝子産物)と結合してホロ酵素と なり、メチルマロニル CoA のスクシニル CoA への異性化 に関与する.このように, *cbl* 遺伝子の産物は B<sub>12</sub>の細胞 内輸送,あるいは酵素本体として重要な代謝に関わってい ることが明らかにされつつある.

動物の B<sub>12</sub> 代謝システムを大腸菌の場合(図 16B)と対 比させてみると、両者が非常によく似ていることが分か る.最近、ある細菌の MeaB タンパク質が MCM を不活性 化から保護する G タンパク質シャペロンであることが示 唆された<sup>134)</sup>.一方、筆者らは大腸菌の YgfD タンパク質<sup>135)</sup> が大腸菌 MCM(Sbm タンパク質)<sup>136)</sup>の再活性化因子とし て機能することを見出した<sup>137)</sup>. MeaB や YgfD はヒトの MMAA タンパク質(*cblA* 遺伝子産物)<sup>138)</sup>と高い相同性を 示すことから、MMAA は動物 MCM の再活性化因子であ る可能性が高い.ごく最近、ヒト MMAA タンパク質の立 体構造が報告された<sup>139)</sup>.また、ヒトの MMAB タンパク質 (*cblB* 遺伝子産物)<sup>140)</sup>はアデノシルトランスフェラーゼで あることが知られているので、哺乳類の AdoCbl 関与酵素 も再活性化因子、補酵素再生系を含む活性維持システムを もつと考えられる.

# (3) MeCbl 関与酵素の活性維持システム

ヒトはもう一つの B<sub>12</sub> 関与酵素である MS ももってい る. MSはB<sub>1%</sub>という1価コバルトを含む超活性種を触媒 に利用する. B<sub>12</sub> は容易に酸化を受けて2価コバルトを含 む B<sub>12</sub>になるため,酵素は不活性化され易い(平均約) 1,700回の触媒回転後)<sup>78)</sup>. 大腸菌 MS では、フラボドキシ ン(FMN タンパク質)とフラボドキシンレダクターゼ(FAD タンパク質)から成る還元系が働くことにより B12r が B12r へと再還元され<sup>141,142)</sup>, AdoMet による再メチル化<sup>79)</sup>を受け て酵素活性を回復する(図5).ヒトを含む哺乳類はこの 還元系をもたないが, Gravel らは FMN と FAD の両方を 含むジフラビンレダクターゼが再還元に関与しているとい う予測をたて、メチオニンシンターゼレダクターゼ (MSR) 遺伝子をクローン化することに成功した<sup>143)</sup>. MSR は図 16 の cblE 遺伝子産物に相当し、MS のコバラミン還 元酵素として、また分子シャペロンとしても働く再活性化 タンパク質である<sup>144)</sup>.したがって、ヒトがもつ二つの B<sub>12</sub> 関与酵素にはいずれも活性維持システムが備わっているこ とになる.

# 7. おわりに

これまでに確立された酵素触媒の化学機構は本質的に極 性機構で触媒する酵素のためのものであり、ラジカル酵素 のように非極性機構で触媒する酵素の反応機構の理解には 新しい概念が必要である.筆者はこのような考えに基づ き、B<sub>12</sub>関与酵素の反応機構研究を徹底的に進めることで、 ラジカル酵素一般に通用する触媒原理を解明しようとして きた.生体触媒の究極的な理解には生化学、構造生物学、 理論化学を基盤とした三位一体の研究が不可欠であるとい う信念のもと、三つの B<sub>12</sub> 酵素の立体構造を解析し、超活 性種がタンパク質分子装置により副反応が厳密に抑制さ れ、特定の反応だけを起こす強力な "飛び道具"として活 用されている謎を解いてきた.活性部位アミノ酸残基の寄 与を考慮に入れた精密触媒機構を確立し、補酵素の構造と 機能の関係や立体化学経路も説明できたことは大きな喜び であった.しかし、この方向性だけで酵素の再設計や人工 酵素設計の可能な時代に突入できるとは思えない―何か新 しいブレークスルーが必要である.それは酵素学の非経験 的学問化ではないかと考えて、理論化学者と連携し、B<sub>12</sub> 酵素の精密反応機構の検証と計算化学的変異導入による活 性部位残基の非経験的機能解析を試み、成功を収めた.将 来、酵素の分子工学的改変のための指針が計算により(実 験することなく)得られるようになることを期待したい.

さらに、高活性な反面不活性化され易い B<sub>12</sub> 酵素やラジ カル酵素を研究していると、酵素は本体だけでなく、活性 維持に関わる補助タンパク質とのシステムとして研究すべ きことが痛感される. 微生物ではこれらが一つのオペロン にコードされていることから、超活性種を触媒に利用する 酵素の不活性化は織り込み済みで、活性維持システムによ り対処していることがうかがえる. ヒトを含む哺乳類でも 同様であることが最近の研究で明らかになりつつある.

本稿で述べてきた筆者らの研究が,超活性種関与酵素だ けでなく,酵素研究一般にいささかでも刺激をもたらすも のであれば望外の喜びである.

#### 謝辞

筆者らの研究のうち,X線構造解析は姫路工業大学安岡 教授(当時)グループおよび兵庫県立大学樋口教授・柴田 准教授グループ,理論計算は九州大学吉澤教授・蒲池助教 グループとの共同研究の成果である.他は岡山大学大学院 自然科学研究科(工学部生物機能工学科)酵素機能設計学 研究室で行われたものである.ご協力いただきました全て の共同研究者の方々に深甚なる謝意を表します.

# 文 献

- 1) 虎谷哲夫(2002) 生化学, 74, 87-102.
- Dolphin, D., ed. (1982) B<sub>12</sub>, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York.
- Banerjee, R., ed. (1999) Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>, John Wiley & Sons, New York.
- 4) Buckel, W. & Golding, B.T. (1996) Chem. Soc. Rev., 25, 329–337.
- Buckel, W., Bröker, G., Bothe, H., Pierik, A., & Golding, B. T. (1999) in *Chemistry and Biochemistry of B*<sub>12</sub> (Banerjee, R. ed.), pp. 757–781, John Wiley & Sons, New York.
- 6) Banerjee, R. (2003) Chem. Rev., 103, 2083–2094.
- Rétey, J. (1982) in B<sub>12</sub> (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 357– 379, John Wiley & Sons, New York.

- Abeles, R.H. (1979) in *Vitamin B*<sub>12</sub> (Zagalak, B. & Friedrich, W. eds.), pp. 373–388, Walter de Gruyter, Berlin.
- Toraya, T. & Fukui, S. (1982) in B<sub>12</sub> (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 233–262, John Wiley & Sons, New York.
- Toraya, T. (1994) in *Chemistry and Biochemistry of B*<sub>12</sub> (Banerjee, R. ed.), pp. 783–809, John Wiley & Sons, New York.
- 11) Toraya, T. (2003) Chem. Rev., 103, 2095-2127.
- 12) Babior, B.M. (1982) in B<sub>12</sub> (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 263–287, John Wiley & Sons, New York.
- 13) Vandarian, V. & Reed, G.H. (1999) in *Chemistry and Biochemistry of B*<sub>12</sub> (Banerjee, R. ed.), pp. 757–781, John Wiley & Sons, New York.
- 14) Baker, J.J. & Stadtman, T.C. (1982) in B<sub>12</sub> (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 203–232, John Wiley & Sons, New York.
- 15) Frey, P.A. (2010) in Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology (Mander, L. & Lui, H.-W., eds.), pp. 501–546, Elsevier, Oxford.
- 16) Blakley, R.L. (1982) in B<sub>12</sub> (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 381–418, John Wiley & Sons, New York.
- 17) Stubbe, J. & Donk, W.A. (1998) Chem. Rev., 98, 705-762.
- 18) Taylor, R.T. (1982) in  $B_{12}$  (Dolphin, D. ed.), Vol. 2, pp. 307–355, John Wiley & Sons, New York.
- Matthews, R.G. (1999) in *Chemistry and Biochemistry of B*<sub>12</sub> (Banerjee, R. ed.), pp. 681–706, John Wiley & Sons, New York.
- 20) Ragsdale, S.W. (1999) in *Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>* (Banerjee, R. ed.), pp. 633–653, John Wiley & Sons, New York.
- 21) Sauer, K. & Thauer, R.K. (1999) in *Chemistry and Biochemistry of B*<sub>12</sub> (Banerjee, R. ed.), pp. 655–679, John Wiley & Sons, New York.
- 22) Zagalak, B., Frey, P.A., Karabatsos, G.L., & Abeles, R.H. (1966) J. Biol. Chem., 241, 3028–3035.
- 23) Abeles, R.H. & Zagalak, B. (1966) J. Biol. Chem., 241, 1245–1246.
- 24) Frey, P.A., Essenberg, M.K., & Abeles, R.H. (1967) J. Biol. Chem., 242, 5369–5377
- 25) Frey, P.A. & Abeles, R.H. (1966) J. Biol. Chem., 241, 2732– 2777.
- 26) Frey, P.A., Kerwar, S.S., & Abeles, R.H. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 873–879.
- 27) Essenberg, M.K., Frey, P.A., & Abeles, R.H. (1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 1242–1251.
- 28) Rétey, J., Umani-Ronchi, A., Seibl, J., & Arigoni, D. (1966) *Experientia*, 22, 502–503.
- 29) Rétey, J., Umani-Ronchi, A., & Arigoni, D. (1966) Experientia, 22, 72–73.
- 30) Babior, B.M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 449-456.
- 31) Carty, T.J., Babior, B.M., & Abeles, R.H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6313–6317.
- 32) Carty, T.J., Babior, B.M., & Abeles, R.H. (1974) J. Biol. Chem., 249, 1683–1688.
- 33) Babior, B.M., Carty, T.J., & Abeles, R.H. (1974) J. Biol. Chem., 249, 1689–1695.
- 34) Abeles, R.H. & Lee, H.A., Jr. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 695–702.
- 35) Cockle, S.A., Hill, H.A.O., Williams, R.J.P., Davies, S.P., & Foster, M.A. (1972) J. Am. Chem. Soc., 94, 275–277.
- 36) Finlay, T.H., Valinsky, J., Mildvan, A.S., & Abeles, R.H. (1973) J. Biol. Chem., 248, 1285–1290.
- 37) Valinsky, J.E., Abeles, R.H., & Fee, J.A. (1974) J. Am.

Chem. Soc., 96, 4709-4710.

- 38) Babior, B.M., Moss, T.H., & Gould, D.C. (1972) J. Biol. Chem., 247, 4389–4392.
- 39) Babior, B.M., Moss, T.H., Orme-Johnson, W.H., & Beinert, H. (1974) J. Biol. Chem., 249, 4537–4544.
- 40) Toraya, T., Krodel, E., Mildvan, A.S., & Abeles, R.H. (1979) *Biochemistry*, 18, 417–426.
- 41) Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S., & Hogenkamp, H.P.C. (1977) J. Biol. Chem., 252, 963–970.
- 42) Toraya, T., Matsumoto, T., Ichikawa, M., Itoh, T., Sugawara, T., & Mizuno, Y. (1986) J. Biol. Chem., 261, 9289–9293.
- 43) Ichikawa, M. & Toraya, T. (1988) Biochim. Biophys. Acta, 952, 191–200.
- 44) Fukuoka, M., Nakanishi, Y., Hannak, R.B., Kräutler, B., & Toraya, T. (2005) FEBS J., 272, 4787–4796.
- 45) Ishida, A. & Toraya, T. (1993) Biochemistry, 32, 1535-1540.
- 46) Toraya, T. & Ishida, A. (1991) J. Biol. Chem., 266, 5430– 5437.
- 47) Fukuoka, M., Yamada, S., Miyoshi, S., Yamashita, K., Yamanishi, M., Zou, X., Brown, K.L., & Toraya, T. (2002) *J. Biochem.*, **132**, 935–943.
- 48) Toraya, T., Miyoshi, S., Mori, M., & Wada, K. (1994) Biochim. Biophys. Acta, 1204, 169–174.
- 49) Ishida, A., Ichikawa, M., Kobayashi, K., Hitomi, T., Kojima, S., & Toraya, T. (1993) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 39, 115– 125.
- 50) Poppe, L., Stupperich, E., Hull, W.E., Buckel, T., & Rétey, J. (1997) Eur. J. Biochem., 250, 303–307.
- 51) Mancia, F., Keep, N.H., Nakagawa, A., Leadlay, P.F., McSweeney, S., Rasmussen, B., Bösecke, P., Diat, O., & Evans P.R. (1996) *Structure*, 4, 339–350.
- 52) Shibata, N., Masuda, J., Tobimatsu, T., Toraya, T., Suto, K., Morimoto, Y., & Yasuoka, N. (1999) *Structure*, 7, 997–1008.
- 53) Bandarian, V. & Reed, G.H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 12069–12075.
- 54) Weisblat, R.A. & Babior, B.M. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6064–6071.
- 55) Padmakumar, R., Padmakumar, R., & Banerjee, R. (1997) *Biochemistry*, 36, 3713–3718
- 56) Marsh, E.N.G. & Ballou, D.P. (1998) Biochemistry, 37, 11864–11872.
- 57) Yamanishi, M., Ide, H., Murakami, T., & Toraya, T. (2005) *Biochemistry*, 44, 2113–2118.
- 58) Bender, G., Poyner, R.R., & Reed, G.H. (2008) Biochemistry, 47, 11360–11366.
- 59) LoBrutto, R., Bandarian, V., Magnusson, O.T., Chen, X., Schramm, V.L., & Reed, G.H. (2001) *Biochemistry*, 40, 9– 14.
- 60) Buettner G.R. & Coffman, R.E. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 480, 495–505.
- 61) Boas, J.F., Hicks, P.R., Pilbrow, J.R., & Smith, T.D. (1978) J. Chem. Soc. Faraday II, 74, 417–431.
- 62) Bothe, H., Darley, D.J., Albracht, S.P.J., Gerfen, G.J., Golding, B.T., & Buckel, W. (1998) *Biochemistry*, 37, 4105– 4113.
- 63) Yamanishi, M., Yamada, S., Muguruma, H., Murakami, T., Tobimatsu, T., Ishida, A., Yamauchi, J., & Toraya, T. (1998) *Biochemistry*, 37, 4799–4803.
- 64) Abend, A., Nitsche, R., Bandarian, V., Stupperich, E., & Rétey, J. (1998) Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 37, 625–627.
- 65) Abend, A., Bandarian, V., Nitsche, R., Stupperich, E., Rétey, J., & Reed, G.H. (1999) Arch. Biochem. Biophys., 370, 138-

141.

- 66) Drennan, C.L., Huang, S., Drummond, J.T., Matthews, R.G., & Ludwig, M.L. (1994) Science, 266, 1669–1674.
- 67) Toraya, T., Shirakashi, T., Kosuga, T., & Fukui, S. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 69, 475–480.
- 68) Bachovchin, W.W., Eagar, R.G. Jr., Moore, K.W., & Richards, J.H. (1977) *Biochemistry*, 16, 1082–1092.
- 69) Poznanskaya, A.A., Yakusheva, M.I., & Yakovlev, V.A. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 484, 236–243.
- 70) Toraya, T., Tamura, N., Watanabe, T., Yamanishi, M., Hieda, N., & Mori, K. (2008) J. Biochem., 144, 437–446.
- 71) Pierik, A.J., Graf, T., Pemberton, L., Golding, B.T., & Rétey, J. (2008) Chembiochem., 9, 2268–2275..
- 72) Kaplan, B.H. & Stadtman, E.R. (1968) J. Biol. Chem., 243, 1794–1803.
- 73) Lee, H.A. Jr. & Abeles, R.H. (1963) J. Biol. Chem., 238, 2367–2373.
- 74) Wagner, O.W., Lee, H.A. Jr, Frey, P.A., & Abeles, R.H. (1966) J. Biol. Chem., 241, 1751–1762.
- 75) Schwartz, P.A. & Frey, P.A. (2007) *Biochemistry*, 41, 1695–1702.
- 76) Yamanishi, M., Yamada, S., Ishida, A., Yamauchi, J., & Toraya, T. (1998) J. Biochem., 124, 598–601.
- 77) Schrauzer, G.N. & Deutsch, E. (1969) J. Am. Chem. Soc., 91, 3341–3350.
- 78) Yamada, K., Yamada, S., Tobimatsu, T., & Toraya, T. (1999) J. Biol. Chem., 274, 35571–35576.
- 79) Taylor, R.T. & Weissbach, H. (1969) Arch. Biochem. Biophys., 129, 745–766.
- 80) Tobimatsu, T., Hara, T., Sakaguchi, M., Kishimoto, Y., Wada, Y., Isoda, M., Sakai, T., & Toraya, T. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 7142–7148.
- 81) Tobimatsu, T., Azuma, M., Matsubara, H., Takatori, H., Niida, T., Nishimoto, K., Satoh, H., Hayashi, R., & Toraya, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 22352–22357.
- 82) Akita, K., Hieda, N., Baba, N., Kawaguchi, S., Sakamoto, H., Nakanishi, Y., Yamanishi, M., Mori, K., & Toraya, T. (2010) *J. Biochem.*, 147, 83–93.
- 83) Tobimatsu, T., Sakai, T., Hashida, Y., Mizoguchi, N., Miyoshi, S., & Toraya, T. (1997) Arch. Biochem. Biphys., 347, 132–140.
- 84) Yamanishi, M., Yunoki, M., Tobimatsu, T., Sato, H., Matsui, J., Dokiya, A., Iuchi, Y., Oe, K., Suto, K., Shibata, N., Morimoto, Y., Yasuoka, N., & Toraya, T. (2002) *Eur. J. Biochem.*, 269, 4484–4494.
- 85) Shibata, N., Tamagaki, H., Hieda, N., Akita, K., Komori, H., Shomura, Y., Terawaki, S., Mori, K., Yasuoka, N., Higuchi, Y., & Toraya, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 26484–26493.
- 86) Reitzer, R., Gruber, K., Jog, G., Wagner, U.G., Bothe, H., Buckel, W., & Kratky, C. (1999) *Structure*, 7, 891–902.
- 87) Berkovitch, F., Behshad, E., Tang, K.H., Enns, E.A., Frey, P. A., & Drennan, C.L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 15870–15875.
- 88) Toraya, T., Sugimoto, Y., Tamao, Y., Shimizu, S., & Fukui, S. (1971) *Biochemistry*, 10, 3475–3485.
- 89) Masuda, J., Shibata, N., Morimoto, Y., Toraya, T., & Yasuoka, N. (2000) *Structure*, 8, 775–788.
- 90) Toraya, T., Honda, S., & Mori, K. (2010) Biochemistry, 49, 7210–7217.
- 91) Toraya, T. (1985) Arch. Biochem. Biophys., 242, 470-477.
- 92) Toraya, T., Watanabe, N., Ichikawa, M., Matsumoto, T., Ushio, K., & Fukui, S. (1987) J. Biol. Chem., 262, 8544-

8550.

- 93) Lenhert, P.G. & Hodgkin, D.C. (1961) Nature, 192, 937-938.
- 94) Masuda, J., Shibata, N., Morimoto, Y., Toraya, T., &
- Yasuoka, N. (2001) J. Synchrotron Rad., 8, 1182–1185. 95) Toraya, T. (2000) Cell. Mol. Life Sci., 57, 106–127.
- 96) Shibata, N., Masuda, J., Morimoto, Y., Yasuoka, N., & Toraya, T. (2002) *Biochemistry*, 41, 12607–12617.
- 97) Warncke, K. & Utada, A.S. (2001) J. Am. Chem. Soc., 123, 8564–8572.
- 98) Shibata, N., Nakanishi, Y., Fukuoka, M., Yamanishi, M., Yasuoka, N., & Toraya, T. (2003) J. Biol. Chem., 278, 22717–22725.
- 99) Shibata, N., Higuchi, Y., & Toraya, T. (2011) Biochemistry, 50, 591–598.
- 100) Kawata, M., Kinoshita, K., Takahashi, S., Ogura, K., Komoto, N., Yamanishi, M., Tobimatsu, T., & Toraya, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 18327–18334.
- 101) Kinoshita, K., Kawata, M., Ogura, K., Yamasaki, A., Watanabe, T., Komoto, N., Hieda, N., Yamanishi, M., Tobimatsu, T., & Toraya, T. (2008) *Biochemistry*, 47, 3162–3173.
- 102) Ogura, K., Kunita, S., Mori, K., Tobimatsu, T., & Toraya, T. (2008) FEBS J., 275, 6204–6216.
- 103) Diziol, P., Haas, H., Rétey, J., Graves, S.W., & Babior, B.M. (1980) Eur. J. Biochem., 106, 211–224.
- 104) Yamanishi, M., Kinoshita, K., Fukuoka, M., Tanokuchi, A., Saito, T., Ikeda, Y., Shibata, N., Tobimatsu, T., & Toraya, T., *FEBS J.*, in press.
- 105) Toraya, T., Yoshizawa, K., Eda, M., & Yamabe, T. (1999) J. Biochem., 126, 650–654.
- 106) Toraya, T., Eda, M., Kamachi, T., & Yoshizawa, K. (2001) J. Biochem., 130, 865–872.
- 107) Eda, M., Kamachi, T., Yoshizawa, K., & Toraya, T. (2002) Bull. Chem. Soc. Jpn., 75, 1469–1481.
- 108) Smith, D.M., Golding, B.T., & Radom, L. (2001) J. Am. Chem. Soc., 123, 1664–1675.
- 109) Kamachi, T., Toraya, T., & Yoshizawa, K. (2004) J. Am. Chem. Soc., 126, 16207–16216.
- 110) Kamachi, T., Doitomi, K., Takahata, M., Toraya, T., & Yoshizawa, K. (2011) *Inorg. Chem.*, 50, 2944–2952.
- 111) Kamachi, T., Toraya, T., & Yoshizawa, K. (2007) Chem. Eur. J., 13, 7864–7873.
- 112) Schwartz, P.A., LoBrutto, R., Reed, G.H., & Frey, P.A. (2007) Protein Sci., 16, 1157–1164.
- 113) Kamachi, T., Takahata, M., Toraya, T., & Yoshizawa, K. (2009) J. Phys. Chem. B, 113, 8435–8438.
- 114) Frey, P.A. (1990) Chem. Rev., 90, 1343-1357.
- 115) Toraya, T., Kuno, S., & Fukui, S. (1980) J. Bacteriol., 141, 1439–1442.
- 116) Forage, R.G. & Foster, M.A. (1982) J. Bacteriol., 149, 413– 419.
- 117) Bradbeer, C. (1965) J. Biol. Chem., 240, 4669-4674.
- 118) Honda, S., Toraya, T., & Fukui, S. (1980) J. Bacteriol., 143, 1458–1465.
- 119) Ushio, K., Honda, S., Toraya, T., & Fukui, S. (1982) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 28, 225–236.
- 120) Mori, K., Tobimatsu, T., Hara, T., & Toraya, T. (1997) J.

Biol. Chem., 272, 32034-32041.

- 121) Bobik, T.A., Xu, Y., Jeter, R.M., Otto, K.E., & Roth, J.R. (1997) J. Bacteriol., 179, 6633–6639.
- 122) Toraya, T. & Mori, K. (1999) J. Biol. Chem., 274, 3372– 3377.
- 123) Mori, K. & Toraya, T. (1999) Biochemistry 38, 13170– 13178.
- 124) Tobimatsu, T., Kajiura, H., Yunoki, M., Azuma, M., & Toraya, T. (1999) J. Bacteriol., 181, 4110–4113.
- 125) Mori, K., Bando, R., Hieda, N., & Toraya, T. (2004) J. Bacteriol., 186, 6845–6854.
- 126) Kajiura, H., Mori, K., Tobimatsu, T., & Toraya, T. (2001) J. Biol. Chem., 276, 36514–36519.
- 127) Mori, K., Hosokawa, Y., Yoshinaga, T., & Toraya, T. (2010) *FEBS J.*, 277, 4931–4943.
- 128) Shibata, N., Mori, K., Hieda, N., Higuchi, Y., Yamanishi, M., & Toraya, T. (2005) *Structure*, **13**, 1745–1754.
- 129) Havemann, G.D. & Bobik, T.A. (2003) J. Bacteriol., 185, 5086–5095.
- 130) Tobimatsu, T., Kawata, M., & Toraya, T. (2005) Biosci. Biotech. Biochem., 69, 455–462.
- 131) Tobimatsu, T., Nishiki, T., Morimoto, M., Miyata, R., & Toraya, T. (2009) Arch. Microbiol., 191, 199–206.
- 132) Fan, C., Cheng, S., Liu, Y., Escobar, C.M., Crowley, C.S., Jefferson, R.E., Yeates, T.O., & Bobik, T. A. (2010) Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A., 107, 7509–7514.
- Gravel, R.A., Mahoney, M.J., Ruddle, F.H., & Rosenberg, L.
  E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 3181–3185.
- 134) Padovani, D. & Banerjee, R. (2006) *Biochemistry*, 45, 9300– 9306.
- 135) Froese, D.S., Dobson, C.M., White, A.P., Wu, X., Padovani, D., Banerjee, R., Haller, T., Gerlt, J.A., Surette, M.G., & Gravel, R.A. (2009) *Microbiol. Res.*, 164, 1–8.
- 136) Haller, T., Buckel, T., Rétey, J., & Gerlt, J.A. (2000) *Biochemistry*, **39**, 4622–4629.
- 137) Mori, K., Tajiri, M., Tanaka, Y., Haigaki, Y., Tsukada, H., & Toraya, T., manuscript in preparation.
- 138) Dobson, C.M., Wai, T., Leclerc, D., Wilson, A., Wu, X., Doré, C., Hudson, T., Rosenblatt, D.S., & Gravel, R.A. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 15554–15559.
- 139) Froese, D.C., Kochan, G., Muniz, J.R.C., Wu, X., Gileadi, C., Ugochukwu, E., Krysztofinska, E., Gravel, R.A., Oppermann, U., & Yue, W. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 38204–38213.
- 140) Dobson, C.M., Wai, T., Leclerc, D., Kadir, H., Narang, M., Lerner-Ellis, J.P., Hudson, T.J., Rosenblatt, D.S., & Gravel, R. A. (2002) Hum. Mol. Genet., 11, 3361–3369.
- 141) Fujii, K. & Huennekens, F.M. (1974) J. Biol. Chem., 249, 6745–6753.
- 142) Fujii, K., Galivan, J.H., & Huennekens, F.M. (1977) Arch. Biochem. Biophys., 178, 662–670.
- 143) Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H.Q., Rommens, J.M., Schrer, S.W., Rosenblatt, D.S., & Gravel, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 3059–3064.
- 144) Yamada, K., Gravel, R.A., Toraya, T., & Matthews, R.G. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103, 9476–9481.