ビルトイン型補酵素の構造、機能と生合成機構

岡 島 俊 英,中 井 忠 志,谷 澤 克 行

酵素が多彩な触媒機能を発揮するためには金属イオンや補酵素が必要である.B群ビタ ミンに由来する通常の補酵素と異なり、タンパク質を構成するアミノ酸残基から直接形成 される補酵素(ビルトイン型補酵素)が数多く見つかっている.これらのビルトイン型補 酵素は、酸化還元反応や脱離反応など種々の酵素反応に必須の役割を果たしている.ビル トイン型補酵素を形成するためにタンパク質はさまざまな戦術を用いている.翻訳直後の タンパク質のフォールディング過程で自動的に形成されるものがある一方、活性化因子と も呼ぶべき別のタンパク質の関与で複雑な化学変換反応を受けて形成されるものもある. 本稿では、これまでに同定されたビルトイン型補酵素について、構造と機能、および生合 成機構の概略を述べるとともに、芳香族アミノ酸残基に由来するビルトイン型キノン補酵 素の生合成機構に関する最近の研究の進展を紹介する.

1. はじめに

生物の生命活動は、3,500種類を超える多種多様な酵素 が触媒する化学反応により維持されている.酵素はその実 体がタンパク質であるため、基本的には20種類のアミノ 酸残基で構成されている.しかし、タンパク質単独で機能 しているものはむしろ少数派である.酵素の多くは補欠分 子として金属イオンや有機低分子、すなわち'補酵素'を 活性部位に含んでおり、多彩な触媒機能の発現にそれらの 化学反応性を利用している.生物進化の過程で生じたさま ざまな代謝反応を触媒するため、20種類のアミノ酸残基 に乏しい化学反応性(たとえば、求電子的性質)を酵素に 付与する必要性が補酵素を生んだと考えることができる. ピリドキサールリン酸(PLP)やフラビン補酵素(FMN, FAD)など補酵素の多くは、酵素タンパク質とは別に B 群ビタミンから生合成された後、不活性なアポ酵素に最終 的に組込まれ、活性型のホロ酵素を形成する.一方、これ らの典型的な補酵素と異なり,アミノ酸残基としてポリペ プチド鎖中に組込まれた形で存在する補酵素が数多く見い だされてきた(表1).これらは以下のように定義され, 総称して'ビルトイン型補酵素'と呼ばれている¹.

- ・タンパク質のポリペプチド鎖中にアミノ酸残基として 組込まれている.
- ・ビタミン由来の補酵素と同様に,触媒活性に必須の役 割を担う.
- ・遺伝子中では通常のアミノ酸残基(もしくは翻訳終止 コドン)としてコードされている.
- ・何らかのタンパク質翻訳後修飾を受けて生成する.

ビルトイン型補酵素は補酵素の中では少数派ではある が、通常の補酵素にはない利点がある.第一に、化学的な 反応性は高いが水溶液中では不安定な補酵素でも、疎水的 なタンパク質内部においては安定に造り出すことが可能と なる.第二に、細胞内で必要量が合成され複数の酵素に よって利用される汎用性の高いビタミン由来の補酵素と異 なり、ビルトイン型補酵素は個々の酵素タンパク質中のア ミノ酸残基から創りだされる点で、酵素自身にとっては他 の生合成系に依存しない合理的な補酵素形成法であるとい える.本稿では、これまでに同定されたビルトイン型補酵 素について、構造と機能、および生合成機構の概略を述べ るとともに、チロシンやトリプトファンなどの芳香族アミ ノ酸残基に由来するビルトイン型キノン補酵素に焦点を当

大阪大学産業科学研究所生体触媒科学研究分野(〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1)

Mechanisms of biosynthesis of built-in cofactors

Toshihide Okajima, Tadashi Nakai and Katsuyuki Tanizawa (Department of Structural Molecular Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka 567–0047, Japan)

	表1 おもなビルトイン型補酵素の種類,	所在、および含有	酵素とその触媒反応など	
ビルトイン型補酵素	含有する酵素	触媒反応	所 在	対応コドン
(1) 自己触媒的反応で形 ピルビン酸	成されるビルトイン型補酵素 ヒスチジンデカルボキシラーゼ S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ アスパラギン酸 B-デカルボキシラーゼ ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ イ-ホスホパントテノイルシステインデカルボキシラーゼ D-プロリンレダクターゼ	脱炭酸反応 濾 一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一	乳酸菌, Clostridium 属細菌 細菌, 酵母, 動物, 植物 Escherichia coli 細菌, 酵母, 動物 Escherichia coli, 動物肝臓 Clostridium sticklandii	Ser
MIO	フェニルアラニンアンモニアリアーゼヒスチジンアンモニアリアーゼ	脱離反応	酵母、カビ、高等植物 Pseudomonas 属などの細菌、高等動物	Ser
TPQ LTQ チロシルチオエーテル	鋼合有アミンオキンダーゼ リジルオキシダーゼ ガラクトースオキシダーゼ グリオキサールオキシダーゼ	酸化反応酸化反応酸化反応	細菌、酸豆、カビ、植物、動物 細菌、動物組織 哺乳動物組織 Dactylium dendroides 及び近縁のカビ Phanerochaete chrysosporium(カビ)	Tyr Tyr, Lys Tyr, Cys
(2) 活性化因子(変換閣 ホルミルグリシン TTQ	i素)により形成されるビルトイン型補酵素 サルファターゼ アルカリホスファターゼ メチルアミンデヒドロゲナーゼ	加水分解反応加水分解反応脱水素反量	動物, 細菌 (Pseudomonas aeruginosa など) Rhizobium leguminosarum Paracoccus 属, Methylobacterium 属細菌	Ser ズは Cys Trp, Trp
стд	芳香族アミンデヒドロゲナーゼキノヘムプロテイン・アミンデヒドロゲナーゼ	脱水素反応	Alcaligenes faecalis Paracoccus 属, Pseudomonas 属などの細菌	Cys, Trp
(3) 終止コドンの特異化 セレノシステイン	サプレッションにより形成されるビルトイン型補酵素 グルタチオンペルオキシダーゼ グリシンレダクターゼ ギ酸デヒドロゲナーゼ ヒドロゲナーゼ	邁 元 反示 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一	哺乳動物組織,赤血球 Clostridium 属細菌 Escherichia coli, Methanococcus 属細菌 Methanococcus 属細菌	UGA
ピロリジン	ーコチン酸ヒドロキシラーゼ チオレドキシンレダクターゼ ヨードサイロニン 5-デヨーディナーゼ D-プロリンレダクターゼ メチルアミンメチルトランスフェラーゼ	大酸化反反 過光反応 動活反応 表反応 不可応	Clostridium barkeri 高等動物組織 動物組織 Clostridium sticklandii Methanosarcina barkeri	UAG

692

てて,その生合成機構に関する最近の研究の進展を紹介する.

2. 生合成機構によるビルトイン型補酵素の分類

ビルトイン型補酵素は、生合成機構により分類すると大 きく以下の3グループに分類できる。各グループのビルト イン型補酵素の化学構造を図1に、含有する酵素の種類と 関与する触媒反応、所在する主な生物種、遺伝子中で対応 するアミノ酸コドンを表1にまとめた。なお、個々のビル トイン型補酵素の生合成機構や触媒機能の詳細について は、以前の総説¹⁰を参照されたい。

2-1 自己触媒的反応で形成されるビルトイン型補酵素

翻訳されたタンパク質から自動的に形成されるビルトイ ン型補酵素として、ピルビン酸、3,5-ジヒドロ-5-メチリデ ン-4H-イミダゾール-4-オン (MIO)、トパキノン (2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン;TPQ)、リジル チロシルキノン (LTQ)、チロシルチオエーテルがある (図1). ピルビン酸と MIO は、緑色蛍光タンパク質(GFP) における蛍光発色団の自動形成反応と類似した反応 (セリ ン残基の側鎖水酸基 (またはペプチド結合のイミノ窒素) によるペプチド結合カルボニル炭素への求核攻撃)により 形成される.また,後述する TPQ をはじめとして,LTQ やチロシルチオエーテルのようなチロシン残基に由来する ビルトイン型補酵素の形成には2価銅イオンが必須で,補 酵素前駆体のチロシン残基が近傍に存在する結合銅イオン により活性化されることで反応が開始する.銅イオン依存 的・非依存的いずれの場合も,立体構造を形成した(また はフォールディング過程の)前駆体タンパク質の立体構造 が修飾反応の残基特異性を決めている.ピルビン酸とチロ シルチオエーテルの形成反応はペプチド鎖の開裂を伴い, インテイン介在配列の翻訳後切り出し反応(プロテインス プライシング)とも反応機構的に共通する点が多い.

2-2 活性化因子(変換酵素)により形成されるビルトイン型補酵素

酵素タンパク質とは別の特異的な活性化因子(変換酵素) の働きによって生成するビルトイン型補酵素として、ホル ミルグリシン、トリプトファントリプトフィルキノン (TTQ)、システイントリプトフィルキノン (CTQ)がある (図1).サルファターゼという酵素の活性中心にホルミル グリシンが形成されるためには活性化因子が必要であるこ



図1 生合成機構によって分類した種々のビルトイン型補酵素の化学構造

- (A) 自己触媒的反応で形成されるビルトイン型補酵素.
- (B) 活性化因子 (変換酵素) により形成されるビルトイン型補酵素.

(C) 終止コドンの特異的サプレッションにより形成されるビルトイン型補酵素.

とが分かったのは、ヒトの遺伝病の解析がきっかけとなっ ている². ヒトには基質特異性を異にする少なくとも9種 類のサルファターゼ・アイソザイムが存在するが、これら の全アイソザイムの活性が一斉に消失している遺伝性の病 気(多サルファターゼ欠損症:MSD)が知られている. MSD 症は、すべてのサルファターゼの活性中心システイ ン残基をホルミルグリシンに変換して活性化する因子の遺 伝子に欠陥または欠損があるために起こることが証明され た.この活性化因子に関しては、最近、異なる反応機構を もつ2種類の酵素(ホルミルグリシン生成酵素,サルファ ターゼ成熟化酵素)の構造や反応機構が明らかにされてい る^{3,4)}. ホルミルグリシンは、これまでサルファターゼにの み存在することが知られていたが、最近 Rhizobium leguminosarum 菌のアルカリホスファターゼの活性中心にも存在 することが報告された⁵⁾.一方,TTQとCTQの形成機構 については未解明な点が多いが、後述のように TTQ 前駆 体トリプトファン残基のインドール環の酸化に関わるタン パク質⁶⁾が見つかっている.

2-3 終止コドンの特異的サプレッションにより形成され るビルトイン型補酵素

遺伝子中では翻訳終止コドン (UGA または UAG)となっ ているが、特異的 tRNA により認識されてビルトイン型補 酵素が形成されるものとして、セレノシステインとピロリ ジンがある (図1). セレノシステインとピロリジンは. それぞれコドン表における 21 番目, 22 番目のアミノ酸と 呼ばれている.タンパク質翻訳過程における UGA コドン に対応する部位へのセレノシステインの取り込みは、動物 と微生物のいずれの系においても基本的には共通した機構 で進行し、少なくとも四つの因子(セリンを結合するサプ レッサー tRNA, セレノシステイニル tRNA 合成酵素, セ レノシステイニル tRNA 特異的伸長因子,活性化セレン供 給因子)が必要であることが明らかにされている". セレ ノシステインはtRNAに結合したセリンが2段階の酵素反 応を受けて tRNA 分子上で形成され、これが翻訳過程でポ リペプチド鎖に取り込まれる.一方, ピロリジンはピロリ ジン合成系の酵素によって遊離アミノ酸として合成された 後、ピロリジル tRNA 合成酵素によって UAG コドンのサ プレッサー tRNA に直接転移される⁸. ピロリジル tRNA 合成酵素の立体構造が古細菌。と真正細菌心の酵素で解明 され, UAG コドンを用いた遺伝暗号拡張の分子基盤が明 らかになりつつある.従って、タンパク質中でのセレノシ ステインとピロリジンの両残基の生成は、正しくはタンパ ク質の翻訳後修飾ではなく、翻訳に同調して進行する '翻 訳中修飾'である.

3. トパキノン (TPQ)

3-1 銅含有アミンオキシダーゼ

動植物や微生物に広く分布している銅含有アミンオキシ ダーゼは、種々の一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触 媒する酵素であり、生成物としてアルデヒド、アンモニ ア,および過酸化水素を生じる11-13).本酵素の生理的役割 は生物種によって異なっている。微生物においては一級ア ミン類を分解代謝する際に働き,培地中にアミンを添加す ることにより本酵素が誘導生成される.植物では、過酸化 水素の生成による細菌感染からの自己防御や成長時のポリ アミン濃度の調節、リグニン合成に必要な過酸化水素の供 給などに働いていると考えられている。また、動物におい ては種々の生理活性アミン類の体内濃度調節を行うと考え られているが、直接の基質となるアミンの種類は未同定で ある.近年,糖尿病患者において本酵素アイソザイムの一 種、セミカルバジド感受性アミンオキシダーゼ(SSAO) の異常な活性化14が確認されるなど疾患との関係が研究さ れているが、ヒトを含む高等動物における本酵素の生理的 役割に関しては未解明な点が多い.なお,SSAO は血管内 皮で膜結合型として存在し、炎症部位の血管内皮への白血 球の接着に機能しており、vascular adhesion protein 1(VAP-1)¹⁵⁾とも呼ばれている.

本酵素は起源によらず同一サブユニットからなる二量体 構造をもち,その分子量は約7~9万である.各サブユ ニットの活性中心に銅イオンとTPQ(図1)を一つずつ含 んでいて両者は触媒機能発現に必須である¹⁶⁾.TPQは480 nm 付近を極大とする吸収帯を有しており,このため本酵 素の濃い溶液はピンク色を呈する.

本酵素の触媒反応経路は, TPO の酸化還元状態に基づ いて還元的半反応と酸化的半反応の二つに大きく分けられ る^{16,17}(図2). 前半の還元的半反応では,酸化型 TPO の5 位カルボニル基と基質アミンの間で基質シッフ塩基が形成 された後, 基質のα位プロトンが触媒塩基(保存性アス パラギン酸残基)によって引き抜かれ、生成物シッフ塩基 に変換される.これが加水分解され、アルデヒドと還元型 TPQ が生成する.従って、TPQ は還元的半反応において ピリドキサールリン酸と同様な機能を担う.後半の酸化的 半反応では、還元型 TPO が分子状酸素に電子を渡し、過 酸化水素とアンモニアを生成するとともに酸化型 TPQ が 再生される.反応全体では、基質アミンから酸素分子に各 2個の電子とプロトンが受け渡されることになり、TPQ は 電子とプロトンとを一時的に溜める'変換器'(transducer) のような働きをする¹⁶. 触媒活性に必須の銅イオンは、還 元的半反応では直接的には関わらず、酸化的半反応におい て還元型 TPQ により Cu¹⁺へと1 電子還元されることで酸 素分子への電子移動を仲介すると考えられてきた¹⁸.しか



詳細は本文参照のこと.

し、詳細な反応速度論的解析や Co²⁺や Ni²⁺への金属置換 型酵素の解析から、銅イオンの役割はむしろ還元型酸素分 子種 (スーパーオキシド、ヒドロペルオキシド) が速やか にプロトン化されるための結合部位を提供することである と考えられ¹⁷⁾,酸素分子は還元型 TPO から直接還元され るという説の方が有力となる時期があった17,19).しかしな がら、最近になり、酸化的半反応のストップトフロー解 析²⁰⁾やハロゲンイオンによる阻害機構の解析(未発表)か ら酸素分子の還元は Cu¹⁺によると結論された. すなわち, 還元型 TPQ は Cu²⁺に1 電子を与えることでセミキノン型 となる一方, 電子は Cu¹⁺から酸素に流れる (図 2). 酸素 分子への次の1電子移動が銅イオンを経由するかセミキノ ン型 TPQ から直接的に起こるのかは不明であるが、結果 的に TPQ は酸素を2電子還元する点でフラビン補酵素と 同様な機能をもつ.以上のように、TPO がピリドキサー ルリン酸とフラビン補酵素というビタミン由来の二つの補 酵素機能を併せもつことは、他のビルトイン型キノン補酵 素 (TTQ, LTQ) にも共通している.

3-2 銅イオンによる TPQ の自動生成

銅含有アミンオキシダーゼの遺伝子配列中では TPQ は チロシン残基としてコードされている. TPQ の生成機構 に関する研究は,遺伝子組換えにより前駆体型(アポ型) 酵素を容易に調製できるようになったことによって大きく 進展した^{21,22}. 私たちは,約17年前に土壌細菌 Arthrobacter globiformis 由来のアミンオキシダーゼ (AGAO) を, 銅イオン制限培地を用いて大腸菌内で発現させることによ り,無色で活性のないアポ酵素を得ることに成功した.こ のアポ酵素に Cu²⁺を加えてインキュベートすると,TPQ に由来する 480 nm の吸収が増加し,酵素は顕著に活性化 された.さらに,この Cu²⁺による活性化は嫌気的条件下 では全く起こらなかった.これらの結果より,TPQ の生 成は Cu²⁺依存的なチロシン残基の自動酸化反応 (酵素タ ンパク質を主体的に見ると,自己触媒的反応とみなすこと ができる)であると結論された²³⁾.

3-3 X線結晶解析による TPQ 生成反応の追跡

では、酵素タンパク質のアミノ酸配列中で数多く存在す るチロシン残基のうち、特定の残基がどのような機構で TPQ に変換されるのであろうか? 私たちはこの残基特 異的な TPQ 生成機構がタンパク質の立体構造に起因する と考え、まず、アポ型とホロ型 AGAOのX線結晶解析を 行った²⁰. 両者の主鎖の立体構造に大きな違いはなく、分 子内部に深く埋もれた活性部位の構造にのみわずかな違い が見られた. 従って、TPQ 生成に伴う構造変化は活性部 位近傍に限られると考えられた. アポ酵素では、3 個の ヒスチジン残基側鎖のイミダゾール環窒素原子(His431, His433, His592)と Tyr382 残基のフェノール環 OH 基の 酸素原子がほぼ四面体型に配置されており、当然ながら銅 の結合部位は空であった(図3, A). 一方、ホロ酵素では



図3 X線結晶解析に基づく TPQ の生成機構²⁷⁾

AGAO における TPQ 生成過程の中間体構造を活性部位残基のスティックモデルで図示している(TPQ 部分のみ電子密度図を メッシュで示した). A:アポ酵素(銅イオン結合前)の構造. B:銅イオンに Tyr382 が配位した初期反応中間体の構造. C: 銅イオンは Tyr382 の解離した 4-OH 基を通じて部分的に電子を引き寄せることで Tyr382 のフェノール環を活性化する. C→D →E:活性部位近傍の疎水ポケットに結合した酸素分子が Tyr382 の3位を攻撃し、ペルオキシ反応中間体(D)を経て、ドー パキノン(DPQ)反応中間体を形成する. E→F→G:銅イオンにより活性化された水分子(水酸化物イオン)が DPQを攻撃し (F)、トリヒドロキシル反応中間体(還元型 TPQ)が形成される. DPQ反応中間体の生成後、Cβ-Cγ結合を軸にキノン環が180° 近く回転する. G→H:還元型 TPQ が酸素分子により酸化され、最終の酸化型 TPQ が生成する. なお、全反応経路(B→H)に おいて、His592 側鎖のコンホメーションが変化し、銅イオン配位構造が微妙に変化している.

3 個のヒスチジン残基に加えて 2 個の水分子が銅イオンに 配位しており、その配位構造は底面がやや歪んだピラミッ ド(四角錐)型であった.他の生物起源の酵素の活性部位 構造 25,26 と同様、TPQ は C α -C β と C β -C δ の結合周りの大 きな回転によって、結合銅イオンからはかなり離れた方向 に向いていた(図3, H).これらの構造は、TPQ 生成反 応の最初と最後の活性部位構造を示すものである.

次に,銅イオンの結合とそれに引き続いて起こるチロシ ン残基(Tyr382)の酸化的修飾反応過程のダイナミックな 構造変化を捉えるために,時間分割 X 線結晶解析を行っ た.幸い,結晶中での TPQ 生成反応は溶液中での反応よ りはるかに遅く進行したので,ミリ秒オーダーの構造変化 を解析する特別な方法(例えば,ラウエ法など)を用いる 必要はなかった.具体的には,まず厳密な嫌気条件下でア ポ酵素の結晶を作製し,嫌気条件を保ったまま Cu²⁺を加 えた.この結晶を液体窒素温度で凍結し,銅イオンを結合 しただけの TPQ 生成の第一段階の構造として解析を行っ た.次いで,結晶を好気的な(酸素を含む)緩衝液に移す ことにより TPQ 生成反応を開始させ,一定時間毎に結晶 を凍結した.これらの結晶についてデータ取得と解析を 行った結果,期待通り TPQ 生成途上の三つの中間体の構 造を決定することに成功した²⁷⁾(図 3).こうして得られた 各構造は,TPQ 生成反応過程における準安定な中間体構 造のスチル写真(スナップショット)ではあるが,それら をつなぎ合わせることにより'ぱらぱらマンガ'のような ムービーとして TPQ の生成過程を捉えることができた(次 項参照).これは,タンパク質の翻訳後修飾によるビルト イン型補酵素生成過程の構造変化を明らかにした最初の例 となった.

3-4 TPQ 生成機構

上に述べた時間分割 X 線結晶解析に基づいて,以前の

分光学的解析によって提唱されていた TPQ 生成過程の各 段階に中間体の構造をあてはめ、TPO 生成機構をさらに 精密化した (図 3). 最初の段階 (図 3, B) において, Cu²⁺ はまず三つのヒスチジン残基とチロシン残基に囲まれた四 面体の中心に配位結合する. 酵母由来の酵素を用いた分光 学的・反応速度論的な解析から,前駆体のチロシン残基は 酸素非存在下では Cu²⁺に配位しないと提案されていた²⁸⁾ が、実際には Tvr382 の側鎖水酸基が Cu²⁺に配位している ことが判明した.一般にチロシン残基の酸化は、金属イオ ンへの電荷移動 (ligand-to-metal charge transfer: LMCT) に より Tyr ラジカルが生成し、分子状酸素(三重項)が電子 密度の低下した C3 位を攻撃することによって起こると考 えられている.しかし、ガラクトースオキシダーゼなどに おいてチロシン残基からCu²⁺へのLMCTが起こる距離 (2.0Å)^{29,30)}よりも AGAO における Tyr382-Cu²⁺間の距離は 若干離れている(2.5Å)ことが分かった.溶液中の酵素 の分光学的解析によっても、嫌気条件下では LMCT に特 徴的なスペクトルは得られていない³¹⁾. 従って, 次に起こ る酸素分子のチロシン残基近傍の疎水領域への結合²⁸⁾、あ るいはチロシン残基の OH 基からのプロトンの解離がきっ かけとなって、Tyr382-Cu²⁺間の距離がわずかに接近して LMCT が起こるのかもしれない.

銅イオンを結合した結晶を短時間(10分程度)酸素に さらすことによって観察された中間体(図3, E)は、チ ロシン残基のC3 位が酸化されたドーパキノン(DPO) で あった. TPQ 生成過程でC3 位が最初に酸化(正確には酸 素添加, oxygenation) されることは、様々な研究^{28,32)}から 予測されていたが、化学構造としても同定することができ た.次にCB-Cδ結合を軸として芳香環が180°回転し、そ の結果C2位(DPQのC5位)が銅イオン側に向くことに より,恐らくCu²⁺に配位した水分子または水酸イオン (OH⁻) により攻撃されるのであろう. TPQ の C2 位と C5 位のカルボニル酸素が、それぞれ溶媒の水と分子状酸素に 由来することは、酸素同位体標識実験からも確認されてい る³²⁾.このような芳香環の回転は、次の中間体の構造(図 3, G) と比べると明らかである. 中間体 G では, C2 位に 酸素が結合しており、一見酸化型の TPQ のように見える が、この段階でも結晶は無色のままであったことから、ト リヒドロキシ型の還元型 TPO であると推定された.ここ でも TPQ は依然として C4 位の OH 基を介して銅に配位し た状態であった.最終段階で酸化型 TPO が形成される (O2 による酸化)のに伴い、TPQの大きなコンホメーション 変化が起こりキノン環は銅イオンから離れる(図3,H). この TPQ のキノン環の動きは、周囲のアミノ酸残基には 顕著な構造変化が認められないので、恐らく銅イオンの配 位構造や水素結合ネットワークの変化によってもたらされ るものと考えられる.特に、Cu²⁺への水分子の配位状況と

His592 の側鎖イミダゾール環のコンホメーション変化が 重要かもしれない.このような詳細な TPQ 生成反応の経 路と銅イオンの配位状況変化や各残基のコンホメーション 変化は、反応中間体の立体構造を結晶学的に同定すること によって初めて実証されたといえる.

4. トリプトファントリプトフィルキノン (TTQ)

銅含有アミンオキシダーゼのトパキノン補酵素の構造決 定と相前後して、メタノール資化性細菌のメチルアミンデ ヒドロゲナーゼ (MADH) において、トリプトファン残 基に由来するトリプトファントリプトフィルキノン(TTO) という新しいキノン型の補酵素が同定された33)(図 1). 1980年代の終わり頃にアルコールデヒドロゲナーゼ やグルコースデヒドロゲナーゼの補酵素として発見された ピロロキノリンキノン (PQQ),および前述のチロシン残 基由来のキノン型補酵素 (TPQ, LTQ) とこの TTQ を含 有する酵素を総称して 'キノプロテイン' と呼ぶようになっ た. TTQ は、TPQ と異なり一つのトリプトファン残基の インドール環がオルトキノン型に酸化されていると同時 に、同一ポリペプチド鎖内で約50残基離れた位置のもう 一つのトリプトファン残基と架橋結合した構造を有してい る. TTO を補酵素とする酵素には、MADHの他に芳香族 アミンデヒドロゲナーゼが知られる(表1).

4-1 メチルアミンデヒドロゲナーゼ

TTQ を含有する MADH は、メチルアミンを酸化してホ ルムアルデヒドとアンモニアを生成する反応を触媒する. TTQ はこの触媒過程で基質アミンとシッフ塩基を形成し て還元型となる点で TPQ と同様な補酵素機能を担う.基 質により2電子還元された補酵素は、セミキノンラジカル 中間体を経由して、生理的な電子受容体であるアミシアニ ンと呼ばれるブルー銅タンパク質に電子を受け渡す.

MADHには金属イオンが含まれていないので,TTQは TPQのような金属イオンの存在下でのアミノ酸残基の自 動酸化反応により生成することは考えにくかった.ま た,2個のトリプトファン残基の架橋反応がキノン型への 酸化と共役して起こるのか,全く別の過程で起こるのかも 長らく不明であった.

4-2 TTQ 生合成における MauG タンパク質の役割

グラム陰性細菌 Paracoccus denitrificans の MADH は $\alpha_2\beta_2$ のサブユニット構造をもち(図4, A),各サブユニッ トの構造遺伝子(mauB と mauA)は、11遺伝子で構成さ れる Mau オペロン(mauRFBEDACJGMN)中にコードさ れている. MADHでは、TTQ は β Trp108 と β Trp57の両イ ンドール環の間で架橋が形成されるとともに、 β Trp57が オルトキノン化されている(図4, B). Mau オペロン中の





- (A) QHNDH (*P. denitrificans* 由来)とMADH・MauG 複合体の立体構造. 二量体になっていることを除けば,MADH の α サブユニット (β プロペラ構造をもつ)とTTQ をもつ β サブユニットは,それぞれ QHNDH の β サブユニット (β プロペラ構造をもつ)と CTQ をもつ γ サブユニットに対応する.
- (B) MauG による TTQ 生合成の最終段階の反応(上式)と QHNDH の α サブユニットによる CTQ 形成の 可能性.

11 遺伝子について遺伝子破壊を行うと、 α および β サブ ユニットの構造遺伝子を除く四つの遺伝子(mauD, mauE, mauF,およびmauG)を破壊したときにも、活性 のある MADHが生合成されなかった³⁴⁾. このうち mauG 遺伝子を破壊した場合には、触媒活性をもたない $\alpha_2\beta_2$ 複 合体酵素が生成することが分かった.従って、TTQ 生成 反応は自発的ではなく、少なくとも MauG タンパク質が 関与すると推測された³⁴⁾.しかし、触媒活性をもたない酵 素に含まれる補酵素前駆体の構造解析や MauG の機能解 析は容易ではなかった.大きなブレークスルーは原子レベ ルの組成解析が可能となる精密な質量分析技術の進歩に よってもたらされた.TTQ 前駆体の質量分析の結果、2 個 のトリプトファン残基の間に架橋はなく、 β Trp57 の側鎖 インドール環 C-7 位の1 箇所に水酸基が導入されているこ とが分かった^{35,30} (図 4, B). さらに, MauG は, このよう な不活性型酵素 (TTQ 生成中間体) に強く結合するだけ でなく,酸素および電子供与体,あるいは過酸化水素存在 下,試験管内で不活性 $\alpha_2\beta_2$ 複合体中の TTQ 生成反応を完 結させる活性をもつことも明らかになった.すなわち, MauG はグラム陰性細菌のペリプラズム内で TTQ 生合成 の最終ステップを司る酵素であることが証明された³⁰ (図 4).42 kDa の MauG は, 2 ヘムシトクロム c ペルオキシ ダーゼと相同性を示し,分子内に c 型ヘムを 2 個結合して いる.詳細な電子スピン共鳴測定の結果,2 個のヘム鉄は 異なるスピン特性を有し,過酸化水素存在下では, Fe (IV) = O/Fe (IV)の4 価状態にあることが判明した.こ れらのことから,MADHの β Trp57 の酸化は,MauG のヘム 鉄と過酸化水素の関与で進行すると結論された³⁷⁾.また, βTrp57とβTrp108間の架橋はこの酸化反応と共役して起こると考えられた(図4,B). ごく最近,7位が水酸化されたβTrp57を含むMADH中間体とMauGの複合体の結晶構造(図4,A)が決定されるとともに,この複合体に 過酸化水素を加えることにより複合体結晶中でTTQが生成することが示された³⁸⁾.翻訳直後のMADHのβサブユニットからMauGが基質とする水酸化βTrp57を含む中間体が生成する機構は未解明であるが,TTQの生合成機構 がこのように分子レベルで急速に明らかになりつつある.

5. システイントリプトフィルキノン (CTQ)

酵素タンパク質中に新規な補酵素が見つかることは、それほどたびたびあることではなく、生化学の教科書に出て くるようなビタミン由来の補酵素は何十年も前に発見され ている.ビルトイン型補酵素に限っても、1996年に構造 決定されたLTQ³⁰⁾以来見つかっていなかった.しかし、今 から約10年前、私たちはキノヘムプロテイン・アミンデ ヒドロゲナーゼ(QHNDH)に新しいビルトイン型キノン 補酵素、CTQ(図1)を見いだした.

5-1 キノヘムプロテイン・アミンデヒドロゲナーゼ

補欠分子としてキノンとヘムを併せもつ OHNDH は、2 種類のグラム陰性細菌, P. denitrificans と Pseudomonas putida から別々に単離されそれらの酵素学的性質が調べられ た40,41)が、後に遺伝子構造と立体構造が決定される42-44)と、 一次構造の相同性が低い両酵素の立体構造は驚くほど似て いることが判明した.本酵素は三つの異なるサブユニット (α, β, γ) で構成されており、一級アミン類を脱水素し てアルデヒドに酸化する反応を触媒する. 両細菌の培地中 に*n*-ブチルアミンやベンジルアミンを加えると、これら をエネルギー源として資化するため、本酵素が細胞膜内の ペリプラズム画分に誘導生成される. 触媒反応において は、基質アミンに由来する2電子はキノン補酵素、ヘム c を経由して、アズリンやチトクロム c550 などの電子受容 体タンパク質に受け渡され、最終的には末端酸化酵素によ り分子状酸素の水への還元に使われる40,41). αサブユニッ トには2分子のヘム c が結合しており、 γ サブユニットに はキノン補酵素が含まれていることが分かっていた.しか し、このキノン補酵素の同定はもとより、γサブユニット 全体のアミノ酸配列すらタンパク質化学的に決定すること は非常に困難であった42).

5-2 同一ポリペプチド内に見いだされた2種類の新しい 翻訳後修飾様式

キノン補酵素とそれを含む γ サブユニットの化学構造に 関する疑問は, *P. denitrificans* と *Ps. putida* の QHNDHの 立体構造が相次いで決定されることによって氷解した^{43,44)}.

いずれも共通のヘテロ三量体サブユニット構造をもち(図 4. A),約60 kDaのαサブユニットは、互いに独立した フォールディングをもつ4個のドメイン(I~N)で構成 されていた. おもに α ヘリックスからなるドメインIは ドメイン内に擬2回対称軸を有し、2分子のヘム c がシス テイン残基とチオエーテル結合で共有結合していた.約 40 kDaのβサブユニットは, MADH やメタノールデヒド ロゲナーゼなど他の多くのキノプロテイン・デヒドロゲ ナーゼで見られる7枚羽根のβプロペラ構造をもってい た. 最も小さなγサブユニット(約9kDa)は, α, β両 サブユニット間に挟まれるように分子内に埋もれて存在し ていた. γ サブユニット遺伝子の塩基配列から予測される アミノ酸配列(79及び82残基)中には4個のシステイン 残基と5個のトリプトファン残基が含まれるが、遊離の SH 基や S-S 結合は検出されなかった. 慎重な分子モデリ ングの結果、キノン補酵素は、トリプトファン残基のC6 位とC7位とがオルトキノン型に酸化されていると同時 に、C4位に同一ポリペプチド内のシステイン残基の側鎖 SH 基がチオエーテル結合で架橋したシステイントリプト フィルキノン (CTO) であることが分かった (図1,図5). さらに、驚くべきことに、残りの3個のシステイン残基は その側鎖 SH 基で、アスパラギン酸残基またはグルタミン 酸残基のメチレン炭素にチオエーテル結合していることが 判明した (図5). ガラクトースオキシダーゼでは、チロ シン残基のフェノール環炭素にシステイン残基がチオエー テル結合している²⁹⁾が,酸性残基のメチレン炭素との間の チオエーテル結合はタンパク質中ではこれまでに見いださ れていない.このようなチオエーテル結合は一般的な S-S 還元剤では切断されない化学的に極めて安定な結合である ので, SH 基の定量ができないのは当然であった.また, 質量分析の結果もこれらの架橋構造を考慮することで完全 に解釈することができた42.44). γサブユニットはこれら4 箇所の分子内架橋によって、二次構造が少なく折れ曲がり の多いランダムコイル状の立体構造を維持していると考え られた (図 5, A).

5-3 γサブユニットの構造形成における ORF2 タンパク 質の役割

補酵素 CTQ と 3 箇所の分子内チオエーテル架橋構造は どのようにして形成されるのであろうか? 化学量論的に は,1分子のγサブユニット全体で10 電子の出入りを伴 う,8 個のアミノ酸残基が関係する酸化反応であることか ら,成熟型γサブユニットの形成機構は極めて複雑である ことが容易に推測できる.その上,アスパラギン酸やグル タミン酸といった酸性残基の化学反応性の乏しいメチレン 炭素とシステイン残基の SH 基との間のチオエーテル結合 は,通常の求核反応などによって自動的に形成されること



- 図5 P. denitrificans 由来 QHNDH の γ サブユニットの構造43)
- (A) 結晶構造に基づく γ サブユニットの構造をリボンモデル (CTQ および分子内チオエーテル架橋構造はボール・スティックモ デル) で表示した.
- (B) γサブユニットの構造を平面的かつ模式的に示した.

						ODE3					<u> </u>
ORF1 (α)	ORF1 (α)			ORF2			(γ) OR OR		β)	ORF5	
-											-
		[Fe-S]	-binding M	otif	SA	M-bindin	g Motif		Су	s-rich region	
Paracoccus denitrificans ORF2	121	LNVNTG	CNLACT	CYKE - (34) VV	FF GGE I	P I SNM	-(238)	-YGCKI	CRIRSIC	A GGC YH
Pseudomonas putida ORF2	106	LNVNTG	CNLSCT	C YKE - (34) VV	FF GGE I	SNR	-(238)	- TG <mark>C</mark> ES	CRIRNLC	S GGC ҮН
Sulfatase activating enzyme	30	KPIGPA	CNLACRY	CYYP-(33) FV	WQ <mark>GGE</mark> I	P L LAG	-(238)	- RE <mark>C</mark> QF	CSVKIVC	Q GGC PA
Heme biosynthesis enzyme	32	WNLTRS	CNLKCRH	H <mark>C</mark> YTV-(29)LI	LS GGE I	P M SRF	-(250)	- GR <mark>C</mark> GA	CAYQAVC	GGNTRI
Pyruvate formate-lyase activating enzyme	24	ITFFQG	CLMRCL	CHNR-(33) V T	AS <mark>GGE</mark> 2	ALQA				
Anaerobic ribonucleotide reductase activase	20	TLFVSG	CTHACKO	G C YNQ - (32) LT	LS <mark>GGD</mark> I	PLHPL				
Lysine 2,3-aminomutase	132	FLVTNQ	CSMYCRY	CTRR - (30)VL	LS <mark>GGD</mark> (G L LIN				
RimO	142	VKISDG	CDRGCTE	CSIP-(35) T T	SY <mark>G</mark> ID	LYRKQ				
Biotin Synthase	47	SIKTGA	CPEDCK	CPQS-(121) - KV	CS <mark>GG</mark> I	VGLGE				
Lipoate Synthase	88	MILGAI	CTRRCPE	CDVA-(35)DI	RDGGA	2HFAD				
Spore photoproduct lyase	86	IPFATG	С мбн С н	(CYLQ-(57)IE	HFGQSI	Э ц GКL				

図6 QHNDHの遺伝子構造とORF2タンパク質が含まれるラジカル-SAMタンパク質のアミノ酸配列の比較 代表的なラジカル-SAMタンパク質の [Fe-S] 結合モチーフ, SAM 結合モチーフ,およびC 末端域の Cys リッチ領域(二つ目の [Fe-S] 結合部位の可能性がある)とその周辺のアミノ酸配列について比較した.白抜きの残基と四角の枠で囲んだ部分はコンセンサス 配列,太字は保存性の高いアミノ酸残基を示す.

は困難と思われる.恐らく何らかの修飾酵素が関与する複 雑な反応機構が必要と推定された.また,前述の銅含有ア ミンオキシダーゼ中のTPQと異なり,トリプトファン残 基のインドール環のオルトキノンへの酸化も自己触媒的に 起こるとは考えにくかった(MADHと同様,QHNDHに はヘム鉄以外に金属イオンが含まれていない).

QHNDHの γ サブユニットの翻訳後修飾機構解明への糸 口は遺伝子中に見いだされた.真っ先に着目したのは, QHNDHの α サブユニットと γ サブユニット遺伝子の間に 挟まれてコードされている機能未知の仮想タンパク質 (ORF2タンパク質)⁴³であった(図6).この仮想タンパク 質配列中には,鉄-硫黄クラスターおよび*S*-アデノシルメ チオニン (SAM) の結合部位と相同性の高い配列が含ま れており,ラジカル-SAM スーパーファミリー⁴⁵⁾と呼ばれ るタンパク質群に属することが判明した.ビオチン合成酵 素⁴⁶⁾など,SAMのアデノシン-メチオニン間の C-S 結合を ホモリティックに解裂して生じるアデノシルラジカルを利 用して,炭素-硫黄結合の形成反応を触媒する酵素がこの ファミリーに含まれている.このことから,このタンパク 質がγサブユニットのユニークな構造形成に何らかの関与 をしていると考えて研究を進めた.

ORF2 タンパク質の機能について解析するため、まず相

同組換えによって P. denitrificans の ORF2 遺伝子内にカナ マイシン耐性遺伝子を導入した、さらに、同様の操作によ り、カナマイシン耐性遺伝子を除去し、ORF2 遺伝子破壊 株 ($\Delta ORF2$ 株) を得た. n-ブチルアミンを唯一の C/N 源として含有する最小培地において,野生株とΔORF2株 の増殖能とOHNDH活性を比較した結果、 $\Delta ORF2$ 株は QHNDH 活性を欠失しており、この培地中で増殖すること ができなかった. 炭素源として培地に塩化コリンを追加し たところ、菌体の増殖は回復したが QHNDH 活性は誘導 されなかった.野生株と△ORF2 株においてウェスタンブ ロットにより ORF2 タンパク質の発現を比較した結果,野 生株において細胞質画分に著量発現していた ORF2 タンパ ク質は、ΔORF2株において全く発現していないことが確 認できた. また, ORF2 タンパク質は最小培地に n-ブチル アミンを添加した QHNDH 誘導生成条件下でその発現が 検出されたことから, QHNDH 遺伝子と同一のプロモー ターに支配されていることが分かった. △ORF2 株の最小 培地における増殖能とQHNDH活性は、広宿主域ベク ターを用いて構築した ORF2 タンパク質発現プラスミドを △ORF2 株に導入することによって回復させることができ た.しかし、鉄-硫黄クラスターおよび SAM 結合部位と推 定される配列に変異を導入した ORF2 遺伝子をもつ発現プ ラスミドでは、 $\Delta ORF2$ 株のn-ブチルアミン添加培地で の増殖と OHNDH 活性の回復は見られなかった.これら の結果から、ORF2 タンパク質はラジカル-SAM タンパク 質として QHNDH 生合成,特にγサブユニットの翻訳後修 飾に必須の役割を果たしていると考えられた. QHNDHの 各サブユニットの細胞内局在について調べたところ, αお よびβサブユニットは野生株と同様にΔORF2株において もペリプラズム画分に存在していたが, γサブユニットは 細胞質画分に蓄積していた. このγサブユニットはキノン 染色に反応しなかったので、CTQ は形成されていないと 考えられた. ΔORF2 株の細胞質に蓄積した γ サブユニッ トの翻訳後修飾の状態を解析するため、逆相カラムを用い る HPLC により γ サブユニットのペプチドを精製し, 質量 分析を行った. その結果,細胞質に蓄積したγサブユニッ トは、補酵素生成とチオエーテル結合形成のいずれの翻訳 後修飾も受けていないことが明らかになった. 以上の結果 より、ORF2 タンパク質は、恐らく翻訳途上のγサブユ ニット・ポリペプチドに作用して、アスパラギン酸残基や グルタミン酸残基とシステイン残基との間でチオエーテル 架橋構造を形成する役割を担うと推定された47. 最近,大 腸菌のリボソームタンパク質 S12 中のアスパラギン酸残 基(Asp88)の側鎖β位炭素をメチルチオエーテル化する 新しいラジカル-SAM タンパク質 (RimO) (図 6) が見つ かっており⁴⁸, ORF2 タンパク質との構造や触媒機構の類 似性が注目される.ところで、 $\Delta ORF2$ 株に蓄積した γ サ

ブユニットのN末端には、成熟型γサブユニットにはない28残基のリーダー配列が存在することが明らかになった。このリーダー配列は、通常のペリプラズムへの輸送シ グナルとは異なり、塩基性および酸性残基に富むユニーク な配列をもっていた。このリーダー配列もγサブユニット の形成に必須であることが確かめられた。これは、恐らく ORF2 タンパク質がγサブユニットの翻訳過程で伸長しつ つあるペプチド鎖を結合するための'タグ'(もしくはプ ライマー)として機能していると推定される⁴⁷⁾.

5-4 QHNDH 遺伝子周辺にコードされるその他のタンパ ク質の役割

QHNDH の構造遺伝子を含むオペロンの第5番目にはズ ブチリシン様セリンプロテアーゼに相同性のあるタンパク 質がコードされていることが分かっていた(図6)が, QHNDHとの関係は不明であった⁴³. そこで次に、この ORF5 遺伝子の破壊株を作成し QHNDH 生成に及ぼす影 響を調べた.その結果,ORF2 遺伝子破壊株と同様に, QHNDH 活性がほぼ完全に消失しただけでなくγサブユ ニットが細胞質内に蓄積していた.また,この蓄積したγ サブユニットは、活性のある成熟型γサブユニットよりも やや大きな分子サイズを有しており、28残基のN末端 リーダー配列を保持していた. ORF5 遺伝子破壊株に ORF5 遺伝子をプラスミドで補充したところ、γサブユ ニットはN末端リーダー配列を欠失し,野生株と同様に ペリプラズムへ移行して活性のある QHNDH が生産され た、しかし、セリンプロテアーゼの活性部位を構成する三 つの触媒基 (catalytic triad: Asp/His/Ser) のいずれかに変 異を導入した ORF5 遺伝子では、△ORF5 株の機能を回 復させることはできなかった.これらの結果より,ORF2 遺伝子と同様, ORF5 遺伝子も OHNDH 生合成に必須で あると結論した(未発表).大腸菌内で発現させたORF5 タンパク質は、合成基質に対するプロテアーゼ活性を示さ なかったが、ORF5 タンパク質はγサブユニットのN末端 リーダー配列を特異的に切断する機能を担うプロセッシン グプロテアーゼであると推定している.

近年のゲノムプロジェクトの進展により,多くのグラム 陰性細菌のゲノム中に QHNDH 遺伝子がコードされてい ることが明らかになった.現在,これらの QHNDH 遺伝 子の周辺にコードされていて保存性の高い PimS2 様タン パク質,ABCトランスポーター,転写制御因子などに関 しても,遺伝子破壊等の方法を用いて QHNDH 生合成に おける必須性を順次検討している.

5-5 CTQ の生成機構

QHNDHのγサブユニット中でCTQ 補酵素が生成する 機構はほとんど未解明であるが, MADHのTTQ が MauG

によってペリプラズムにおいて形成される(前述)ことか ら、CTO もペリプラズムにおいて合成されると推定され る. すなわち、細胞質に存在する ORF2 タンパク質や ORF5 タンパク質は CTO 生成には直接関与していないと 考えられる.一方, OHNDH の α サブユニットのc 型ヘム 結合部位にアミノ酸変異を導入し、ヘムを結合できないよ うにすると、γサブユニット中に CTQ が形成されないこ とが分かった(未発表).この結果は、αサブユニット中 の2個のヘムはCTQ形成に必須であることを示唆してい る. グラム陰性菌において、ヘムは一般にペリプラズムで タンパク質に挿入されること、ペリプラズムは細胞質より も酸化的であることを考慮すると、還元的なチオエーテル 架橋形成反応が ORF2 タンパク質の関与のもと細胞質内で 進行するのに対し、CTO はペリプラズム内で生合成され ると推定するのは妥当である.これらのことから、αサブ ユニットはγサブユニット中の CTQ をペリプラズムで生 成する修飾酵素の役割も担っている可能性が浮かび上がっ てきた.

MADHにおける TTQ 生合成の最終段階を司る MauG と QHNDH の α サブユニットがともに 2 分子の c 型へムを含 んでいる点が注目される.私たちは,MauG と QHNDH の α サブユニットは,アミノ酸配列の相同性は低いが類似し た立体構造をもち,同様な機構によってキノン補酵素の生 成反応を触媒するという仮説を立てている (図 4, B).さ らに,QHNDH の α サブユニットは,もともと MauG と 相同的なキノン補酵素生成酵素であったものが,その後の 分子進化の過程で補酵素形成後も γ サブユニットとの複合 体状態を保ち,触媒反応においても電子移動に利用される ようになったのではないかと推測している.このような仮 説が正しいかどうかは,より詳細な CTQ 生成機構の解明 を含め,今後の研究の進展により明らかになると期待して いる.

6. おわりに

遺伝暗号にはない新しいペプチド・ビルトイン型補酵素 が次々と見つかり、タンパク質の翻訳後修飾によるそれら の生成機構が次第に解明されつつある.X線結晶解析や質 量分析を中心とする精密な構造生物学的解析手法の急速な 進展により、これまで見過ごされてきたタンパク質の翻訳 後修飾様式がビルトイン型補酵素以外にも見つかる可能性 は極めて高いと予想される.生物は長い進化の過程で、タ ンパク質に新しい機能を付与するためにさまざまな'しか け'を創りだしてきた.これらのしかけは、究極的には遺 伝情報に内在すると言えるが、遺伝子配列中に直接的には 顕示されていない.生物が創出したさまざまな機能獲得戦 略を解きほぐしていくことが、ポストゲノム時代の生化学 者に課せられた重要な研究課題の一つと考えている.

文 献

- 1) 谷澤克行(1999) 蛋白質核酸酵素, 44, 1947-1958.
- Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A., & von Figura, K. (1995) Cell, 82, 271–278.
- Carlson, B.L., Ballister, E.R., Skordalakes, E., King, D.S., Breidenbach, M.A., Gilmore, S.A., Berger, J.M., & Bertozzi, C. R. (2008) J. Biol. Chem., 283, 20117–20125.
- Benjdia, A., Subramanian, S., Leprince, J., Vaudry, H., Johnson, M.K., & Berteau, O. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 17815–17826.
- Jonas, S., van Loo, B., Hyvönen, M., & Hollfelder, F. (2008) J. Mol. Biol., 384, 120–136.
- Wang, Y., Graichen, M.E., Liu, A., Pearson, A.R., Wilmot, C. M., & Davidson, V.L. (2003) *Biochemistry*, 42, 7318–7325.
- 7) Xu, X.M., Carlson, B.A., Zhang, Y., Mix, H., Kryukov, G.V., Glass, R.S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., & Hatfield, D.L. (2007) *Biol. Trace Elem. Res.*, 119, 234–241.
- Kobayashi, T., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2009) J. Mol. Biol., 385, 1352–1360.
- Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008) *J. Mol. Biol.*, 378, 634–652.
- 10) Lee, M.M., Jiang, R., Jain, R., Larue, R.C., Krzycki, J., & Chan, M.K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374, 470–474.
- 11) Klinman, J.P. & Mu, D. (1994) Annu. Rev. Biochem., 63, 299–344.
- 12) Knowles, P.F. & Dooley, D.M. (1994) in Metal Ions in Biol. Syst. (Sigel, H. & Sigel, A. eds.), pp. 361–403, Marcel Dekker, New York.
- McIntire, W.S. & Hartman, C. (1993) in Principles and Applications of Quinoproteins (Davidson, V.L., ed.), pp. 97–171, Marcel Dekker, New York.
- 14) Mészáros, Z., Karádi, I., Csányi, A., Szombathy, T., Romics, L., & Magyar, K. (1999) Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 24, 299–302.
- 15) Salmi, M. & Jalkanen, S. (2001) Trends Immunol., 22, 211– 216.
- 16) Klinman, J.P. (1996) J. Biol. Chem., 271, 27189-27192.
- 17) Kishishita, S., Okajima, T., Kim, M., Yamaguchi, H., Hirota, S., Suzuki, S., Kuroda, S., Tanizawa, K., & Mure, M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1041–1055.
- 18) Dooley, D.M., McGuirl, M.A., Brown, D.E., Turowski, P.N., McIntire, W.S., & Knowles, P.F. (1991) *Nature*, 349, 262– 264.
- 19) Su, Q. & Klinman, J.P. (1998) Biochemistry, 37, 12513– 12525.
- 20) Shepard, E.M., Okonski, K.M., & Dooley, D.M. (2008) Biochemistry, 47, 13907–13920.
- 21) Tanizawa, K., Matsuzaki, R., Shimizu, E., Yorifuji, T., & Fukui, T. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 1096–1102.
- 22) Cai, D. & Klinman, J.P. (1994) J. Biol. Chem., 269, 32039– 32042.
- 23) Matsuzaki, R., Fukui, T., Sato, H., Ozaki, Y., & Tanizawa, K. (1994) FEBS Lett., 351, 360–364.
- 24) Wilce, M.C., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Matsunami, H., McIntire, W.S., Ruggiero, C.E., Tanizawa, K., & Yamaguchi, H. (1997) *Biochemistry*, 36, 16116–16133.

- 25) Parsons, M.R., Convery, M.A., Wilmot, C.M., Yadav, K.D., Blakeley, V., Corner, A.S., Phillips, S.E., McPherson, M.J., & Knowles, P.F. (1995) *Structure*, 3, 1171–1184.
- 26) Li, R., Klinman J.P., & Mathews, F.S. (1998) Structure, 6, 293–307.
- 27) Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K., & Yamaguchi, H. (2002) *Nature Struct. Biol.*, 9, 591–596.
- 28) Schwartz, B., Dove, J.E., & Klinman, J.P. (2000) Biochemistry, 39, 3699–3707.
- 29) Ito, N., Phillips, S.E.V., Stevens, C., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Keen, J.N., Yadav, K.D.S., & Knowles, P.F. (1991) *Nature*, 350, 87–90.
- 30) Whittaker, M.M., DeVito, V.L., Asher, S.A., & Whittaker, J.W. (1989) J. Biol. Chem., 264, 7104–7106.
- 31) Matsuzaki, R., Suzuki, S., Yamaguchi, K., Fukui, T., & Tanizawa, K. (1995) *Biochemistry*, 34, 4524–4530.
- 32) Nakamura, N., Matsuzaki, R., Choi, Y.H., Tanizawa, K., & Sanders-Loehr, J. (1996) J. Biol. Chem., 271, 4718–4724.
- 33) McIntire, W.S., Wemmer, D.E., Chistoserdov, A., & Lidstrom, M.E. (1991) Science, 252, 817–824.
- 34) van der Palen, C.J., Slotboom, D.J., Jongejan, L., Reijnders, W. N., Harms, N., Duine, J.A., & van Spanning, R.J. (1995) *Eur. J. Biochem.*, 230, 860–871.
- 35) Wang, Y., Graichen, M.E., Liu, A., Pearson, A.R., Wilmot, C. M., & Davidson, V.L. (2003) *Biochemistry*, 42, 7318–7325.
- 36) Wang, Y., Li, X., Jones, L.H., Pearson, A.R., Wilmot, C.M., & Davidson, V.L. (2005) J. Am. Chem. Soc., 127, 8258–8259.
- 37) Li, X., Fu, R., Lee, S., Krebs, C., Davidson, V.L., & Liu, A. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 8597–8600.
- 38) Jensen, L.M., Sanishvili, R., Davidson, V.L., & Wilmot, C.M.

(2010) Science, 327, 1392-1394.

- 39) Wang, S.X., Mure, M., Medzihradszky, K.F., Burlingame, A. L., Brown, D.E., Dooley, D.M., Smith, A.J., Kagan, H.M., & Klinman, J.P. (1996) *Science*, 273, 1078–1084.
- 40) Takagi, K., Torimura, M., Kawaguchi, K., Kano, K., & Ikeda, T. (1999) *Biochemistry*, 38, 6935–6942.
- 41) Adachi, O., Kubota, T., Hacisalihoglu, A., Toyama, H., Shinagawa, E., Duine, J.A., & Matsushita, K. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 469–478.
- 42) Vandenberghe, I., Kim, J.K., Devreese, B., Hacisalihoglu, A., Iwabuki, H., Okajima, T., Kuroda, S., Adachi, O., Jongejan, J. A., Duine, J.A., Tanizawa, K., & Van Beeumen, J. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 42923–42931.
- 43) Datta, S., Mori, Y., Takagi, K., Kawaguchi, K., Chen, Z.W., Okajima, T., Kuroda, S., Ikeda, T., Kano, K., Tanizawa, K., & Mathews, F.S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14268– 14273.
- 44) Satoh, A., Kim, J.K., Miyahara, I., Devreese, B., Vandenberghe, I., Hacisalihoglu, A., Okajima, T., Kuroda, S., Adachi, O., Duine, J.A., Van Beeumen, J., Tanizawa, K., & Hirotsu, K. (2002) J. Biol. Chem., 277, 2830–2834.
- 45) Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., & Miller, N.E. (2001) Nucleic Acids Res., 29, 1097–1106.
- 46) Farh, L., Hwang, S.Y., Steinrauf, L., Chiang, H.J., & Shiuan, D. (2001) J. Biochem., 130, 627–635.
- 47) Ono, K., Okajima, T., Tani, M., Kuroda, S., Sun, D., Davidson, V.L., & Tanizawa, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 13672– 13684.
- 48) Lee, K.H., Saleh, L., Anton, B.P., Madinger, C.L., Benner, J.S., Iwig, D.F., Roberts, R.J., Krebs, C., & Booker, S.J. (2009) *Biochemistry*, 48, 10162–10174.