

## 酵素の構造と機能及び臨床検査への応用—ホルムアルデヒド 脱水素酵素の研究を中心として

伊藤 潔

### Structural and Functional Analysis of Enzymes and Their Application to Clinical Analysis—Study on *Pseudomonas putida* Formaldehyde Dehydrogenase

Kiyoshi ITO

Department of Molecular Medicinal Sciences, Division of Biotechnology,  
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

(Received July 4, 2002)

Formaldehyde dehydrogenase (PFDH) was isolated from the creatinine-decomposing bacterium *Pseudomonas putida*, and its gene has been cloned. PFDH is unique because it was the only enzyme that catalyzed the dehydrogenation of formaldehyde without glutathione. PFDH belongs to a zinc-containing alcohol dehydrogenase family. Quantitative analysis of the reaction products using NMR revealed that the enzyme is not simply a dehydrogenase but is an aldehyde dismutase catalyzing a simultaneous conversion of both aldehyde to carboxylate and aldehyde to alcohol. The enzyme contains a tightly bound cofactor of NAD<sup>+</sup>/NADH per subunit and is classified as a nicotinoprotein. The enzyme reaction can proceed without external addition of the nucleotide cofactor. The formaldehyde was crystallized using the hanging-drop vapor diffusion method with ammonium sulfate as a precipitant. The crystal structure was determined using the multiwavelength anomalous diffraction method with intrinsic zinc ions. The overall structure of PFDH is similar to that of a classic horse liver alcohol dehydrogenase. However, a comparison of these structures indicated that the insertion loop specifically found in PFDH may be responsible for the tight binding of the cofactor, thereby making PFDH a dismutase.

**Key words**—X-ray crystallography; enzyme; nicotinoprotein; formaldehyde; gene cloning; clinical examination

#### 1. はじめに

ゲノム創薬という言葉が日常的に使われるようになってきた。ゲノム情報を基礎として新たな薬を創造していこうとするものである。いろいろな考え方、アプローチがあるが、ゲノム情報の直接の働き手である酵素タンパク質の立体構造を基にして新薬へと発展させることが大きな柱となる。著者もゲノム創薬を目指して、酵素の臨床検査への応用や酵素阻害剤を医薬品へ応用することを大きな目的として、特異な基質特異性や熱安定性を持つ酵素に注目し、遺伝子やタンパク質の構造を解明し、さらに変

異体や阻害剤との複合体の解析から構造の詳細を研究することがゲノム創薬として発展する方向と考え、酵素の構造と機能の研究を行っている。

今日、酵素はさまざまな分野で利用され、歯磨き粉や酵素入り洗剤にはじまり、医薬品としての酵素製剤もある。酵素利用の歴史は長く、酒の醸造などは酵素反応の利用の代表例である。薬学領域における酵素利用も多岐にわたり、臨床検査分析等に用いられる試薬としての酵素、生命科学研究の主要な手段となった遺伝子組換え技術も核酸に作用する酵素反応を組合せた技術に他ならない。

酵素反応の特徴はその特異性にある。臨床検査分析においては、多くの成分が共存している反応液中においても目的の成分のみを特異的に定量することが可能である。加えて、中性付近のpH、常温に近い温度で反応が迅速に進行するため自動分析器へ応用するのが容易であるという利点も有する。酵素は

長崎大学医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻分子創薬科学講座薬品生物工学研究室(〒852-8521 長崎市文教町1-14)

e-mail: k-ito@cc.nagasaki-u.ac.jp

\*本総説は、平成13年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

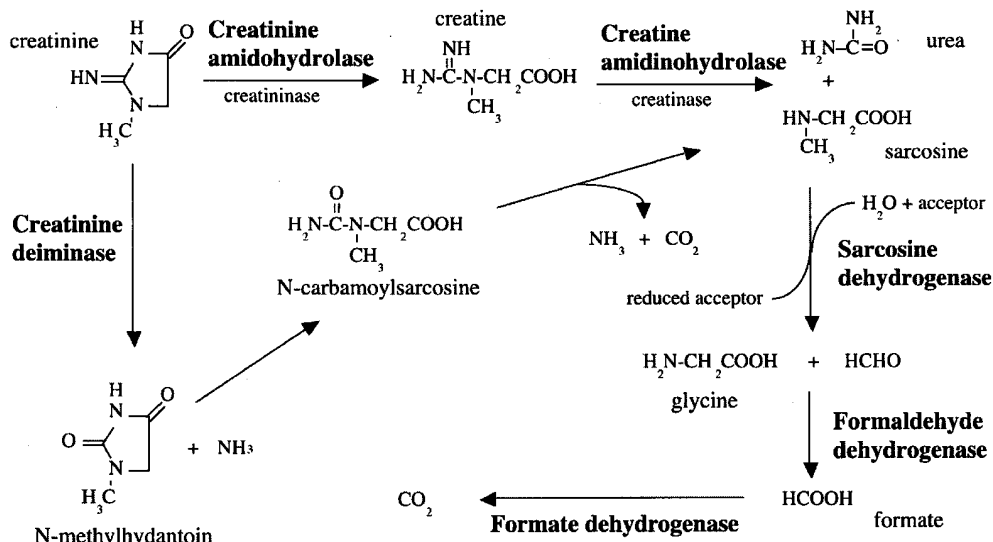


Fig. 1. Pathway for Creatinine Degradation in Microorganisms

タンパク質であるため、試薬として用いるためにはその安定性が問題となることも多かったが、近年、非常に多くの耐熱性酵素が高温環境に生育する微生物から単離され便利に利用されているのは周知の通りである。

本総説では、クレアチニンの臨床検査分析を目的として単離したクレアチニン代謝酵素系の中で、特異な性質を示したホルムアルデヒド脱水素酵素のクローニングから構造解析までを中心に、著者らの研究室の酵素研究の一端を紹介させていただきたい。

## 2. クレアチニン代謝酵素系

クレアチニン量の測定は腎障害のよい指標となる。クレアチニン量の測定には、ヤッフエ (Jaffe) 法が用いられてきたが、共存物による干渉の問題があることから特異性が高く自動分析も可能な酵素法に置き替わってきている。著者らの研究室ではクレアチニン分解菌として *Pseudomonas putida* を見出し、クレアチニンアミドヒドロラーゼ (クレアチナーゼ)、<sup>1)</sup> クレアチンアミジノヒドロラーゼ (クレアチナーゼ)、<sup>2)</sup> サルコシン脱水素酵素、<sup>3)</sup> ホルムアルデヒド脱水素酵素<sup>4,5)</sup> を精製し、性質を明らかにしている。限られた微生物にしか認められていない酵素も含んでいるが、<sup>6)</sup> 微生物のクレアチニン代謝酵素系を Fig. 1 に示した。現在は酵素遺伝子の塩基配列も明らかにされており、いくつかについては X 線結晶構造解析による立体構造も報告されている。<sup>7,8)</sup> 我々も最近クレアチナーゼの結晶化に成功

し、構造を解析中である。

## 3. *Pseudomonas putida* 由来のホルムアルデヒド脱水素酵素 (PFDH)

毒性の強いホルムアルデヒドの酸化に関与するホルムアルデヒド脱水素酵素は大腸菌から植物、ヒトに至るまで生物界にほぼ普遍的に存在している。酵素名からはアルデヒド脱水素酵素類との相同性が類推されるが、相同性はほとんどなく、実は亜鉛含有型のアルコール脱水素酵素 (ADH) であり、クラス III ADH と同一のタンパク質であることが証明されている。<sup>9)</sup> ホルムアルデヒドは直接の基質ではなく、細胞内に mM オーダーに存在するグルタチオン (GSH) との間で非酵素的に生成される S-ヒドロキシメチルグルタチオンが真の基質である。<sup>10)</sup> このことから GSH 依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素 (GSH-FDH) と呼ばれる。補酵素として  $NAD^+$  を要求し、S-ホルミルグルタチオンと  $NADH$  を生成する反応を触媒する。生じた S-ホルミルグルタチオンは別の特異的酵素、S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼによって加水分解され、ギ酸と GSH が生じる (Fig. 2)。細菌のゲノムにおいては、これら 2 つの遺伝子は通常オペロンとして存在している。また、一酸化窒素 (NO) 合成に際して産生される S-ニトロソグルタチオンの分解に GSH-FDH が主要な役割を果たしていることが報告されている。<sup>11)</sup> 一方、著者らの解析している PFDH は反応に GSH を必要としないユニークな性

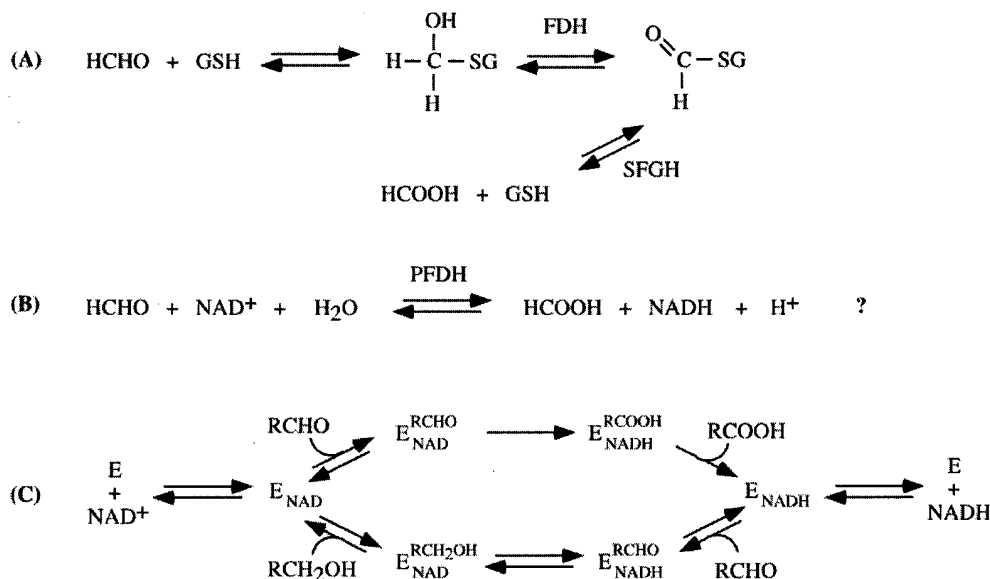


Fig. 2. (A) Reaction Catalyzed by GSH-dependent FDH, (B) Apparent Reaction Catalyzed by PFDH, (C) Proposed Dismutation Reaction Catalyzed by PFDH

質を持つ唯一の酵素であった (Fig. 2).<sup>4)</sup>

#### 4. PFDH 遺伝子のクローニング

まず, *P. putida* から酵素を単一に精製し, 野生型酵素の N 末端側といくつかの臭化シアン分解ペプチドのアミノ酸配列を決定した. これらの情報を基にオリゴヌクレオチドを合成し PCR によって 485 bp の遺伝子断片を得ることができた. *P. putida* の GC 含量が高いことから反応には 5% DMSO の添加が必要であった. この断片をプローブとして, コロニーハイブリダイゼーションによって遺伝子をクローニングした. 遺伝子は 1197 bp のオープンリーディングフレームを有しており, 399 残基のアミノ酸からなる分子量 42 kDa のタンパク質をコードしていた.<sup>12)</sup> 相同性検索の結果, 亜鉛含有型 ADH と 20% 程度の相同性があることが分かった. N 末端側から 3 分の 2 については簡単にアラインメントすることができたが, 残りの 3 分の 1 をアラインさせるのは困難であった. N 末端側には活性に関与する亜鉛を配位する Cys-46, His-67, 及び構造維持に重要であると考えられている亜鉛を配位する Cys-97, Cys-100, Cys-103, Cys-111 がある. さらに補酵素結合ドメインのコンセンサス配列である Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly (194~199) も保存されていた. 活性中心亜鉛の配位に関わる 3 番目のリガンドの Cys 残基は保存されておらず, Cys-166 か Asp-169 のどちらかが関与すると推定された.<sup>13)</sup> そ

の後, PFDH と比較的高い相同性を有する酵素の遺伝子がデータベース上に登録され, 現在では 30% 以上の相同性を有するタンパク質の数は 50 種以上になっている. Figure 3 に 3 種類の PFDH 様酵素 (相同性は 60~66% で全体にわたり相同性がある) と代表的 ADH とのアラインメントを示す. C 末端側のアラインメントは PFDH と ADH の立体構造の 2 次構造情報を基に行ったものである.

#### 5. PFDH の触媒する反応

2 mM 程度までのホルムアルデヒドを用いた実験では, 反応中に消費されるホルムアルデヒド量と生成してくる NADH 量, ギ酸の量はほぼ 1:1 であったので酵素はホルムアルデヒドの脱水素反応を触媒すると考えられた. ホルムアルデヒドの他にアセトアルデヒドとプロパナールでは NADH 量の増加を観察することができたが, 炭素数がブタナール以上のアルデヒドでは 340 nm の吸光度の上昇は認められなかった. しかし, 10 mM のアセトアルデヒドを基質とした反応を解析したところ, 消費されるアルデヒド量に対してはるかに少ない量の NADH しか生成してこないことが分かってきた. そこで, アルデヒド量及び対応するアルコールとカルボン酸の量を NMR を用いて経時的に測定したところ, 2 モルのアルデヒドが消費される間に 1 モルの対応するカルボン酸とアルコールが生成していることが明らかになった. アセトアルデヒドを基質とした場合

PFDH	--SGNRGVVYLGSQKVEVQKIDYPKMQDPRG-----KKIEHGVILKVVSTNITCGSDQHMVR	54
PFDH	--AGNKSIVYHGTRDLRVETVYPKLEHNNR-----KLEHNAVILKVVSTNITCGSDQHTYR	53
BFDH	ALTGNKAVVYKGGKTVAVEDIGYPELILRDGPGVPKANVNRKCEHGVILKVVITNITCGSDQHMVR	65
hEE	--STAGKVIKCKAAVLWEEKPFSEIEVEVAP-----PKAHEVRIKVVATGIICRSDDHVVS	54
hII	--GTKGKVIKCKAAIWEAGKPLCIEIEVEVAP-----PKAHEVRIQIATSLCHTASVID	54
hIII	----SAEVIKCKAAVAWEAGKPVSEIEVEVAP-----PKAHEVRIKI IATAVCHTDAYTLS	52
PFDH	GRTTAQ-VGLVLGHEITGEVIEKGRDVENLQICDLVSVFFNVACGRCRSCKEMHTGVCLT----	113
PFDH	GRFIVP-KGHVLGHEITGEVIEKGRDVELMDICDLVSVFFNVACGRCRNCKEARSVDVCENNL---	114
BFDH	GRTTAP-EGVLGHEITGEVIEKGRDVEFIKKEIDVSVFFNIAACGRVCMCKTQKTHVCLN----	124
hEE	GLVLTVP-LPVIAGHEAACIVESTCEGVTVTRPGDKVIPLFTTPOCGKCRVCKHPEGNFLCKND---	115
hII	SKFEGLAFFVIVGHEAACIVESTCEPGVTNVKPCDKVIPLYAPLCKKCFCLSPILTNLGKISNLK	119
hIII	GADPEGSFPVILGHEGACIVESTCEGVTKLKACDKVIPLYIPOCGECKFCLNPQTNLCQKIR---	114
PFDH	-----VNPARGGAYGYVDMGDWTGCGQAEYLLVPYADFNLLKLPDRDKAMEKIRDLTCLSDIL	171
PFDH	-----VNPADLGAFG-FDLKGWGGQAEYVLPYADYMLLKFGDKEQAMEKIKDLTCLSDIL	171
BFDH	-----VNPDRPGSAYGYVDMGGVWGGQSEYVMVPYADFQLLVFPDKEQALEKILDLTCLSDIF	182
hEE	-LSMPRGTMDGTSRFTCRGKPIHHFLGTSIFFSQYTVVDEISVAKIDAASPLEKIVCLIGCG---F	176
hII	SPASDQQLMEDKTSRFTCKGKPVYHFETGTSIFFSQYTVVSDINLAKIDDDANLERVCLLIGCG---F	181
hIII	-TTGGKGLMPDGTSRFTCKGKTIHYMGTGTSIFSEYTVVADISVAKIDPLAPLDKIVCLLIGCG---V	175
PFDH	PTGYPHCAV-TAGVQPGSTVYVAACAPVGLAAASARLLCAAVTVGDLNPARLAHAKAQC-FEIA	234
PFDH	PTGFHGCV-SAGVKEGSHVYIACAPVGRCAAAACARLLCAACVTVGDNPERLKLSDAC-FETI	234
BFDH	PTGFHCAV-TAGVQPGSTVYIACAPVGLAAAHSAQLLCASTVTVGDLNEDRLADARSFC-CETV	245
hEE	STGYGSAVKVAKVTQGSTCAVFCVGGVGLSVIMGCKAACAARIIGVDINKDKFAKAKEVCATECV	241
hII	STGYGAAIINNAKVTPGSTCAVFCVGGVGLSAVMGCKAACAARIIGVDINSEKFKAKALCATDCL	246
hIII	STGYGAAVNTAKVTPGSTCAVFCVGGVGLAVIMGCKVACAARIIGVDINKDKFAKAKEFCASECI	240
PFDH	DLSLDTPLEQIAALLGPEVDCAVDAVCFEARGHGHEGAKHEAPATVLSNLMQVTRVAGKIGIP	299
PFDH	DLRNSAPLRDQIDQILGKPEVDCGVDVCFEAGHLGDEAN-TEPPNGALNSLFDVVRAGGAIKIP	298
BFDH	NVQKHDLRLEQIEQILGPEVDAAVDCVCFEASGHGNQ---GEAPAVALNSIMDVTVQVGGSLGIP	307
hEE	NPQDYKPKIQEVLTEMSNGGVDVFSFEVIER-----LDTMVTALSCCQEAYGVSVIVGVV	295
hII	NPRDLHKPIQEVIIELTKGGVDFALDCAG-----SETMKAALDCTTAGWGSCTFICVA	300
hIII	NPQDFSKPIQEVLIEMTDGGVDVYSFECIEN-----VKVMRAALEACHKGWGVSVVVGVV	294
PFDH	GLYVTEDPGAVDAAAKIGSLSIRFCVGLWAKSHSFHTQTPVMKYNRAIMQAIMWDRINIAEVVG-	363
PFDH	GIYVGSDDPVPNKDAGSGLRHLDFCKMWTKSIRIMTGMAPVTNYNRHTEAILWQDMPYLSKVMN	363
BFDH	GLYVTEDPGAKDADAKTGLSKIRFCVGLWAKAHTFVTQTPAMTYNRRIMKALLSGRAQIAKAVN-	372
hEE	-----PDSQNLNMPMLLLSRTWKG---AIFGFKSKDSVPKLVADFMAKKFALDPLIT-	347
hII	-----AGSKGLTIFPEELIICRTING---TFFGKWSVDSIPKLVTDYKNKKFNLDALVT-	352
hIII	-----ASGEEIATRPFQLVTCRTWKG---TAFGKWSVESIPKLVSEYMSKKIKVDEFVT-	346
PFDH	VQVLSLDDAPRGYGEFDAGVPKFFVLDPHKTFSAA-----	398
PFDH	IEVITLDDQAPDGYAKFDKSPAKFFVLDPHGMLKNK-----	398
BFDH	ATVLSLDDAPKGYSDFDKCAAKFFVLDPHGTLK-----	405
hEE	-HVLPEKINEGFDLLRSCSIRITLTF-----	374
hII	-HTLPEKISEAFDLMNQCKSVRTILIFGRQCQEQRILSD	391
hIII	-HSLSFQINEAFELMHACKSIRITVVKL-----	373

Fig. 3. Alignment of PFDH-Related Enzymes and Mammalian ADHs

Alignment includes sequences of PFDH (PIR: A55577),<sup>12</sup> *P. putida* formaldehyde dismutase (PFDH) (PIR: JC2516),<sup>14</sup> *Bacillus subtilis* PFDH homologue (BFDH) (DDBJ: D78193),<sup>15</sup> horse class I ADH (hEE) (PIR: A39872),<sup>16</sup> human class II ADH (hII) (PIR: A27109),<sup>17</sup> horse class III ADH (hIII) (PIR: A33419).<sup>18</sup> Identical residues are shown against a black background and partially conserved residues are boxed. Thick lines under the sequences denote insertion loops found in the PFDH structure.

は、生成してくる酢酸量よりわずかに少ない量のエタノールが生成し、その濃度差は生成する NADH 量に等しいことも分かった。すなわち、Fig. 2(C) に示すように、酵素-NAD<sup>+</sup> 複合体はアルデヒドの

恐らくは水和した形を脱水素して対応するカルボン酸を生成し、酵素-NADH 複合体が生じる。これが酵素と NADH に解離するよりも速く新たなアルデヒドが基質として結合し、逆の還元反応となる。

結果としてカルボン酸量と等モルのアルコールが生成し、酵素-NAD<sup>+</sup>複合体が再生してくるという反応が進行していると考えられた。<sup>19)</sup>したがって、PFDHは短鎖のアルデヒドに特異的な脱水素酵素ではなく、Fig. 2(C)の反応を触媒する、いわゆる「dismutase」であると考えられる。前述のように、短鎖アルデヒド基質の場合は酵素-NADH複合体への結合が遅く、NADHの漏れが観察されるが、ブタナール以上のアルデヒドでは十分に速く、反応は真のdismutationとなる。Yanaseらは以前からformaldehyde dismutaseを同様に*Pseudomonas putida*から報告しており、<sup>20)</sup>PFDHも基本的には同類の酵素である。このことはアミノ酸配列の相同性が60%であることとも一致する<sup>15)</sup>(Fig. 3のPFDM)。これらはサブユニット当たり1分子のNAD<sup>+</sup>/NADHを、共有結合ではないが強固に結合しており、ニコチンプロテインと総称される酵素の一群に属する。<sup>21)</sup>実際、NAD<sup>+</sup>を外から加えなくても反応は進行する。理解しやすいニコチンプロテインの例としてUDP-ガラクトース4-エピメラーゼがある。この酵素はUDP-ガラクトースの4位の水酸基の立体を変換する反応を触媒し、中間体としてケトンを生じ、ヒドリドをカルボニル基のどちらかに立体非特異的に再導入することで異性化反応を触媒する。<sup>22)</sup>

## 6. PFDHの構造

クローン化したPFDHはpBluescriptの*lac*プロ

モーター下流につなぐだけで容易に大腸菌中で過剰発現させることができた。<sup>12)</sup>ただし、培養は30°Cで行う必要があった。よく言われていることであるが、発現タンパク質が沈殿してしまう場合、より低温での培養は必ず試すべき条件である。30°C、一晩の培養で全タンパク質の30%以上を占めるPFDHが生産でき、20リットルの培養で500mg以上の精製PFDHを調製できた。結晶化条件をスクリーニングした結果、結晶化は硫酸アンモニウムを沈殿剤として、4mg/ml NAD<sup>+</sup>存在下、蒸気拡散法を用いて行った。<sup>23)</sup>PFDHには強固に結合したNAD<sup>+</sup>/NADHが存在しているが、NAD<sup>+</sup>非存在下では結晶は得られていない。PFDHにはサブユニット当たり2個の亜鉛を含有しているため、その亜鉛を利用し、MAD法を用いたX線結晶構造解析により立体構造を明らかにした。<sup>24)</sup>PFDHはホモ4量体で、2量体の2量体という構造をしており、その2量体は古典的な酵素である馬肝臓のADH 2量体の構造と非常によく似ていた。両酵素の全体から見た構造上の相違は、馬肝ADHのNAD<sup>+</sup>結合領域には存在しない20残基程度の挿入ループの存在である(Fig. 3のアラインメントで太線で示した部分)。このループとアデニン環の間には強固な水素結合のネットワークがあり、ニコチンプロテインとしての性質はこのループが原因ではないかと推定している(Fig. 4)。今後は立体構造情報を基に部位特異的変異法等を駆使して、dismutation反応の触媒機構を

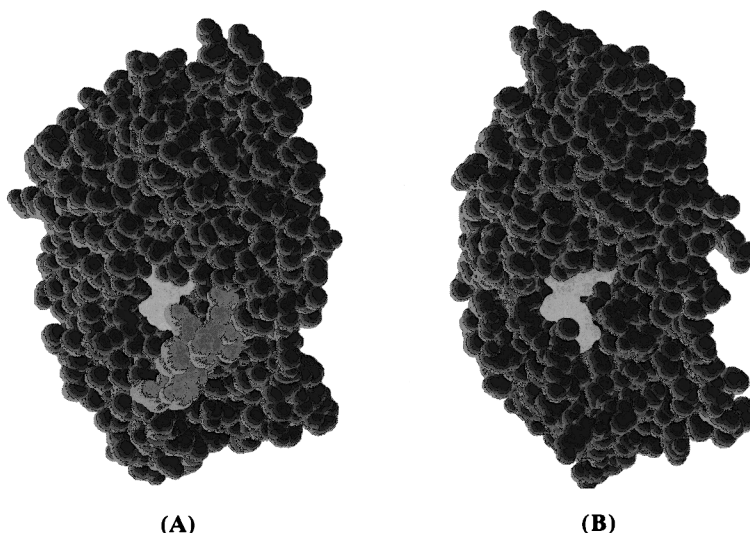


Fig. 4. Space Filling Model Showing (A) PFDH and (B) Horse Liver ADH

NAD<sup>+</sup> molecules are presented in white color at the center of the enzymes. The insertion loop covering the NAD<sup>+</sup> molecule is shown in light grey.

明らかにしていく必要がある。

## 7. その他の特異な基質特異性を持つ酵素の構造解析

特異な脱水素酵素を中心にニコチノプロテインについて述べさせていただいたが、最後に著者らの研究室で行っているその他の酵素の研究をごく簡単に紹介して、普通の生化学者が立体構造解析までを行う利点を考えてみたい。

好熱菌の持つ耐熱性酵素は、その安定性から酵素の応用に最適であり、これまで耐熱性グリセロールキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼを中性脂肪やリン酸の臨床検査試薬として開発してきた。<sup>25-27)</sup> 安定性は、臨床検査試薬としての酵素にとって非常に重要なファクターであることは疑いのないところである。加えて、検査試薬として実用化されるためには、酵素の反応性も保証されなければならない。検査試薬用酵素の構造解析を行うことにより、より厳密な基質選択性の、あるいはより広範囲な選択性を有する酵素を創製できる可能性がある。その過程は酵素の熱安定性と構造の相関や安定性と触媒活性（反応性）の関係を明らかにしていくことにもつながるはずである。

ピログルタミン酸やプロリンは、環状構造という特徴を有するため一般のペプチダーゼによる加水分解を受けにくい。一方、ピログルタミルペプチダーゼやプロリン特異性ペプチダーゼは生体では TRH や多くの生理活性ペプチドの代謝調節に関与することが推定されている。ピログルタミルペプチダーゼとプロリルアミノペプチダーゼの遺伝子をクローニングし、<sup>28,29)</sup> 部位特異的変異体の作製、酵素の X 線結晶解析の結果から、共通した疎水ポケットの存在とフェニルアラニンが基質認識に重要な役割を果たしていることを明らかにした。<sup>30-32)</sup>

## 8. おわりに

ゲノム創薬の観点から、阻害剤の開発、酵素の生理機能に迫っていくためには、立体構造を土台にしたさらに詳細な基質認識機構及び反応機構を明らかにしていくことが必要である。また、さまざまな遺伝子資源を材料として、その産物である酵素タンパク質の構造を基に、組換え DNA 技術を駆使して試薬としての酵素の開発研究を進展させて行く方向もゲノム創薬の 1 つであろう。一般生化学者にとって結晶構造解析は大変な困難を伴うが、パソコン環境

が著しく進化した現在、PDB に登録されている座標データを自由に利用できるようになるだけでもどんなに理解が深まるかを想像していただきたい。義務教育の時代から何回となく聞かされた「鍵と鍵穴」という関係を見ることができ、まさに百分は一見に如かずである。自身のクローン化した遺伝子の産物であるタンパク質の姿を自身で探索することができる利点は極めて大きい。著者の構造生物学は RasMol<sup>33)</sup> というフリーの立体構造表示ソフトをパソコン上で扱うことから始まった。使いはじめるには少々の壁があるが、それだけの価値は十分にある。

**謝辞** 本研究は、長崎大学薬学部薬品生物工学研究室において行われたものであり、同研究室の芳本忠教授に心より厚く御礼申し上げます。また、本研究の機会を最初に与えていただきました前教授の鶴大典先生に心から感謝いたします。本研究は、梶島力博士をはじめ多くの大学院生、4 年生のご協力のもとではじめて遂行することができたものであり、深く感謝の意を表します。さらに、本研究の一部は昭和大学薬学部の中村和郎教授、並びに田中信忠講師、及びカリフォルニア大学サンフランシスコ校の Norman J. Oppenheimer 教授との共同研究であり、深く感謝申し上げます。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費からの援助によるものであり、併せて感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Rikitake K., Oka I., Ando M., Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Biochem.*, **86**, 1109-1117 (1979).
- 2) Yoshimoto T., Oka I., Tsuru D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 508-515 (1976).
- 3) Oka I., Yoshimoto T., Rikitake K., Ogushi S., Tsuru D., *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1197-1203 (1979).
- 4) Ando M., Yoshimoto T., Ogushi S., Rikitake K., Shibata S., Tsuru D., *J. Biochem.*, **85**, 1165-1172 (1979).
- 5) Ogushi S., Ando M., Tsuru D., *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2503-2507 (1986).
- 6) Kim J. M., Shimizu S., Yamada H., *J. Biol. Chem.*, **261**, 11832-11839 (1986).
- 7) Coll M., Knof S. H., Ohga Y., Messerschmidt A., Huber R., Moellering H., Rusmann L., Schumacher G., *J. Mol. Biol.*, **214**, 597-610

- (1990).
- 8) Trickey P., Wagner M. A., Jorns M. S., Mathews F. S., *Structure Fold Des.*, **7**, 331–345 (1999).
  - 9) Koivusalo M., Banumann M., Uotila L., *FEBS Lett.*, **257**, 105–109 (1989).
  - 10) Uotila L., Koivusalo M., *Meth. Enzymol.*, **77**, 314–320 (1997).
  - 11) Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S., *Nature*, **410**, 490–494 (2001).
  - 12) Ito K., Takahashi M., Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Bacteriol.*, **176**, 2483–2491 (1994).
  - 13) Tsuru D., Oda N., Matsuo Y., Ishikawa S., Ito K., Yoshimoto T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1354–1357 (1997).
  - 14) Yanase H., Noda H., Aoki K., Kita K., Kato N., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 197–202 (1995).
  - 15) Ogasawara N., DDBJ/EMBL/GenBank Accession number = D78193, protein\_id = “BAA11283.1”
  - 16) Park D. H., Plapp B. V., *J. Biol. Chem.*, **266**, 13296–13302 (1991).
  - 17) Hoog J. O., von Bahr–Lindstrom H., Heden L. O., Holmquist B., Larsson K., Hempel J., Vallee B. L., Jornvall H., *Biochemistry*, **26**, 1926–1932 (1987).
  - 18) Kaiser R., Holmquist B., Vallee B. L., Jornvall H., *Biochemistry*, **28**, 8432–8438 (1989).
  - 19) Oppenheimer N. J., Henehan G. T. M., Huete–Perez J. A., Ito K., *Enzymol. Mol. Biol. of Carbonyl Metabolism*, **6**, 417–423 (1996).
  - 20) Kato N., Yamagami T., Shima M., Sakazawa C., *Eur. J. Biochem.*, **156**, 59–64 (1986).
  - 21) Piersma S. R., de Vries S., Duine J. A., *Enzymol. Mol. Biol. of Carbonyl Metabolism*, **6**, 425–434 (1996).
  - 22) Thoden J. B., Frey P. A., Holden H. M., *Biochemistry*, **35**, 2557–2566 (1996).
  - 23) Kusakabe Y., Tanaka N., Ito K., Yoshimoto T., Nakamura K. T., *Protein Peptide Letters*, **8**, 237–240 (2001).
  - 24) Tanaka N., Kusakabe Y., Ito K., Yoshimoto T., Nakamura K. T., (submitted).
  - 25) Huang H.–S., Ito K., Yin C.–H., Kabashima T., Yoshimoto T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2375–2381 (1998).
  - 26) Huang H.–S., Ito K., Kabashima T., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **128**, 207–211 (2000).
  - 27) Huang H.–S., Inoue T., Ito K., Yoshimoto T., *Acta Cryst. D.*, **57**, 1030–1031 (2001).
  - 28) Yoshimoto T., Shimoda T., Kitazono A., Kabashima T., Ito K., Tsuru D., *J. Biochem.*, **113**, 67–73 (1993).
  - 29) Kabashima T., Kitazono A., Kitano A., Ito K., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **122**, 601–605 (1997).
  - 30) Yoshimoto T., Kabashima T., Uchikawa K., Inoue T., Tanaka N., Nakamura K. T., Tsuru M., Ito K., *J. Biochem.*, **126**, 559–565 (1999).
  - 31) Ito K., Inoue T., Kabashima T., Kanada N., Huang H.–S., Ma X., Azmi N., Azab E., Yoshimoto Y., *J. Biochem.*, **128**, 673–678 (2000).
  - 32) Ito K., Inoue T., Takahashi T., Huang H.–S., Esumi T., Hatakeyama S., Tanaka N., Nakamura K. T., Yoshimoto T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 18557–18562 (2001).
  - 33) RasMol, URL = “<http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/>”