

微生物に学ぶビタミン B<sub>12</sub> 代謝のシステム酵素学

虎谷 哲夫

Microbe-inspired System Enzymology of Vitamin B<sub>12</sub> Metabolism

Tetsuo TORAYA

*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University,  
3-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan*

(Received July 17, 2010)

Vitamin B<sub>12</sub> is produced only by prokaryotes and utilized by animals as an essential micronutrient. Genetic complementation analysis of cell lines from patients indicated that at least eight gene products are involved in intracellular B<sub>12</sub> metabolism and utilization. We have investigated bacterial adenosylcobalamin-dependent enzymes and elucidated their structure-based fine mechanisms. They tend to undergo mechanism-based inactivation during catalysis, because they use highly reactive radicals for catalyzing chemically difficult reactions. We have discovered molecular chaperone-like reactivating factors for these enzymes that release a damaged cofactor forming apoenzyme. Methylcobalamin-dependent methionine synthase also undergoes inactivation, because it utilizes cob(I)alamin, a super nucleophile, for catalysis. Methionine synthase reductase is a reactivating partner for this enzyme. Recent studies suggested that activity-maintaining systems for B<sub>12</sub> enzymes are present in animal cells as well, and thus hints for designing therapeutic agents for B<sub>12</sub>-related metabolic disorders might be obtained from the investigations of microbial B<sub>12</sub> metabolism.

**Key words**—vitamin B<sub>12</sub>; B<sub>12</sub> metabolism; B<sub>12</sub> enzyme; inactivation; reactivating factor

## 1. はじめに

ビタミン研究において微生物が大きな役割を演じた一例として、ビタミン B<sub>12</sub> の発見を挙げることができる。Whipple (米) は反復瀉血で貧血にしたイヌを用いて造血に有効な食品を探索し、肝臓が有効であることを発見した (1925)。Minot と Murphy (米) はこの結果を応用し、悪性貧血の肝臓療法を発見した (1927)。これを機に、肝臓中の造血因子の単離競争が始まったが、この成分はごく微量しか含まれない上、有効性の判定に時間がかかり、研究は難航した。その後この因子がある種の乳酸菌の増殖因子でもあることが分かり、乳酸菌を用いる簡便なバイオアッセイ法が開発された結果、B<sub>12</sub> の発見が加速されたのである (1948)<sup>1,2)</sup> また、補酵素型の発見においても微生物が主役を演じた。すなわち、Barker (米) らは、細菌におけるグルタミン

酸の異性化反応に光に不安定な形の B<sub>12</sub> が関与することを見出し、暗所でこれを単離した (1958)<sup>3)</sup> これが発見された B<sub>12</sub> の発見である。構造は最終的に Hodgkin (英) らの X 線解析によりアデノシル B<sub>12</sub> (Fig. 1) であると決定された。メチル B<sub>12</sub> は当初、合成によって得られたが、のちに第二の補酵素型であることが分かった。このように、微生物は B<sub>12</sub> の研究において重要な役割を果たしてきた。本総説では、微生物の B<sub>12</sub> 代謝システムの研究が動物の代謝異常症に有効な治療法の開発に貢献できる可能性について述べる。

2. B<sub>12</sub> 欠乏症及びヒトにおける B<sub>12</sub> の輸送と代謝

ビタミン B<sub>12</sub> が欠乏すると悪性貧血や神経障害が起こる。B<sub>12</sub> 欠乏性の貧血では、骨髓液中に巨大な赤芽球がみられるのが特徴である [Fig. 2(A)]。B<sub>12</sub> 欠乏状態では、B<sub>12</sub> 依存酵素であるメチオニンシンターゼ (MS) 活性が低下するために血清ホモシステイン濃度が上昇し、動脈硬化、脳血管障害のリスクも高まる [Fig. 2(B)]。B<sub>12</sub> 欠乏症には、B<sub>12</sub> 投与で治療するすなわち B<sub>12</sub> 反応性のものと、治療

岡山大学大学院自然科学研究科 (〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1)

e-mail: toraya@cc.okayama-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S55 で発表したものを中心に記述したものである。

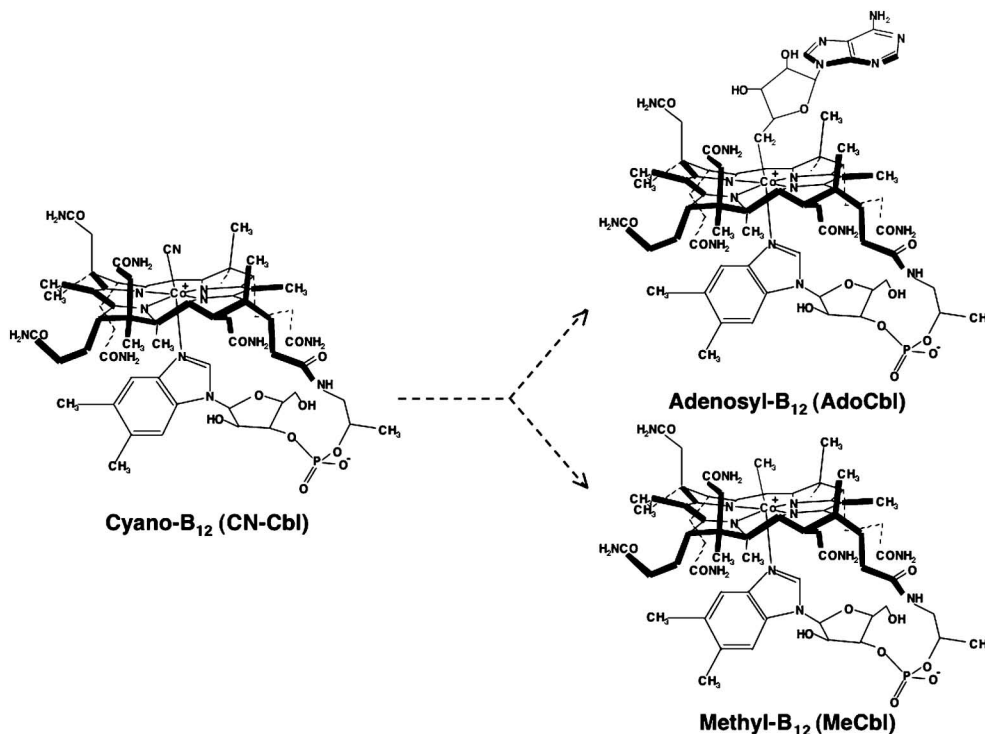


Fig. 1. Two Coenzyme Forms of Vitamin B<sub>12</sub>

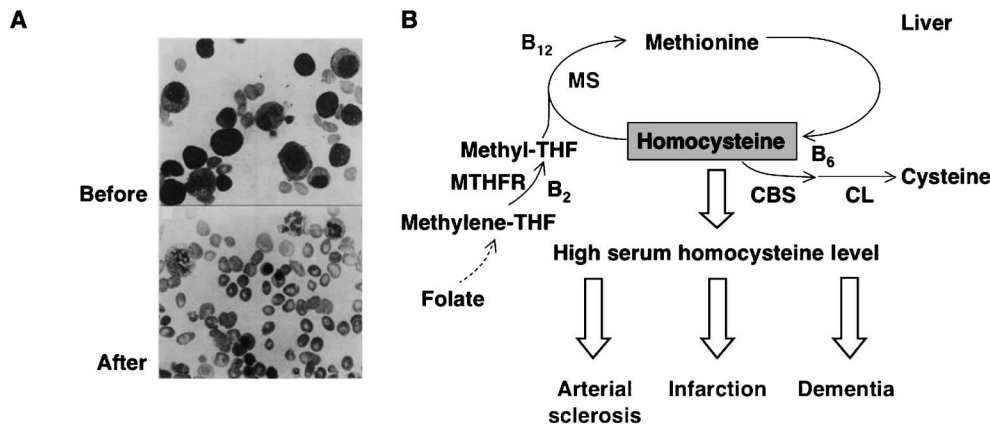


Fig. 2. B<sub>12</sub> Deficiency

A. Pernicious anemia. Bone marrow before and after B<sub>12</sub> administration (by Latham, McGandy, McCann, and Stare). B. Relationship with homocysteine metabolism and vascular disease.

しないすなわち B<sub>12</sub> 不反応性のものがある。反応性のものは B<sub>12</sub> 吸収障害による場合が多く、不反応性のものは B<sub>12</sub> 代謝に障害がある場合が多いと言える。B<sub>12</sub> は食品中に他の B 群ビタミンの 1/100 から 1/1000 くらいしか含まれていない貴重な栄養素なので、われわれは 3 種類の B<sub>12</sub> 結合タンパク質を利用する大変効率のよい吸収・輸送系を進化させてきた。<sup>4)</sup> 食物中の B<sub>12</sub> はタンパク質等 (X) に結合して存在しているが、唾液中には B<sub>12</sub> 結合タンパク質の



虎谷哲夫

岡山大学大学院自然科学研究科教授。工学博士。1945 年福井県生まれ。京都大学工学部工業化学科卒業、同大学院工学研究科工業化学専攻修士課程修了、同博士課程修了。1973 年京都大学工学部助手、1977 年米国ブランダイス大学に留学 (R. H. Abeles 教授)、1982 年京都大学教養部助教授、1989 年岡山大学工学部教授、2006 年より現職。ビタミン B<sub>12</sub> 関与酵素系の研究に従事。

1つであるハプトコリン (HC) が分泌されるので、酸性の胃液中で  $B_{12}$  は X から離れ、HC に結合するようになる。一方、胃からは内因子 (IF) という別の  $B_{12}$  結合タンパク質が分泌される。消化管で HC が膵酵素により分解されると、遊離した  $B_{12}$  が今度は IF に結合する。この複合体は小腸下部 (回腸) で IF 受容体を介して粘膜細胞内に取り込まれる。その後、IF の分解により  $B_{12}$  は遊離し、今度はトランスコバラミン (TC) と結合した形で血液中を運ばれ、TC 受容体を通して細胞内に取り込まれる。これがわれわれの  $B_{12}$  吸収・輸送の仕組みであり、微生物の機構とは大きく異なる。

次に、ヒトにおける細胞内  $B_{12}$  輸送と代謝システムをみていくことにする。 $B_{12}$  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。 $B_{12}$  酵素の活性低下による代謝異常症患者の遺伝子変異を 8 つの相補群に分けた例を Fig. 3(A) に示した。<sup>5)</sup> これらの遺伝子産物の機能はまだすべてが分かっているわけではないが、分かっているものを挙げると、 $B_{12}$  は TC 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  $B_{12}$  は、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メチオニンシンターゼ (*cblG*) と結合してホロ酵素となり、ホモシス

テインのメチル化すなわちメチオニン生成に関与する。一方、ミトコンドリアに取り込まれた還元型  $B_{12}$  は補酵素型となった後、メチルマロニル CoA ムターゼ (*mut*) と結合してホロ酵素となり、メチルマロニル CoA の異性化に関与する。このように、*cbl* 遺伝子の産物は  $B_{12}$  の細胞内輸送、あるいは酵素本体として代謝に係わっていることが明らかにされつつあるが、まだ不明な点も数多く残っている。

動物の  $B_{12}$  代謝システムを大腸菌の場合 [Fig. 3 (B)] 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。現実には、微生物の  $B_{12}$  酵素あるいは代謝システムの研究が動物よりもはるかに進んでいるので、代謝異常症に有効な治療法の開発に貢献できるのではないかと考えられる。

### 3. $B_{12}$ 酵素本体の構造と機能

ヒトはビタミン  $B_{12}$  関与の酵素を 2 つ持っている。1 つ目はメチオニンシンターゼ (MS) で、この酵素は 5-メチルテトラヒドロ葉酸 ( $CH_3-H_4F$ ) のメチル基をホモシステイン (Hcy) に渡してメチオニン (Met) を生成する反応を触媒する [Fig. 4(A)].<sup>6)</sup> この反応ではメチル  $B_{12}$  が補酵素となり、その Co-C 結合がヘテロリシして反応はイオン機構で進行する。この酵素の機能不全により、ホモシステイン尿症の症状が出る。動物の酵素はまだ立体構造が解

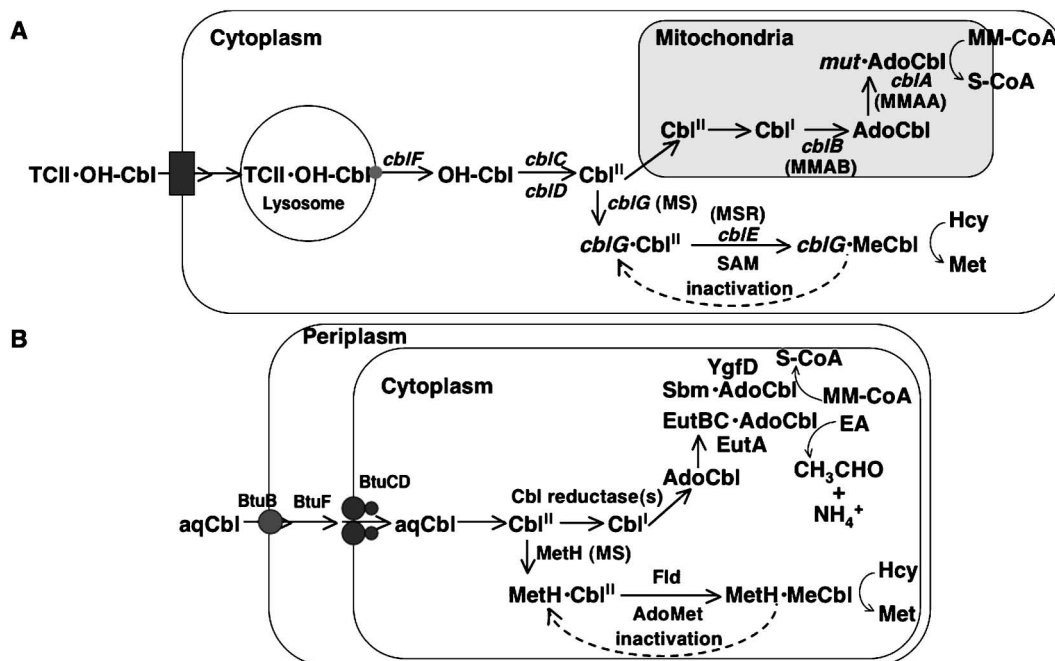


Fig. 3.  $B_{12}$  Trafficking and Metabolism in Animals Cells (A) and in *E. coli* Cells (B)

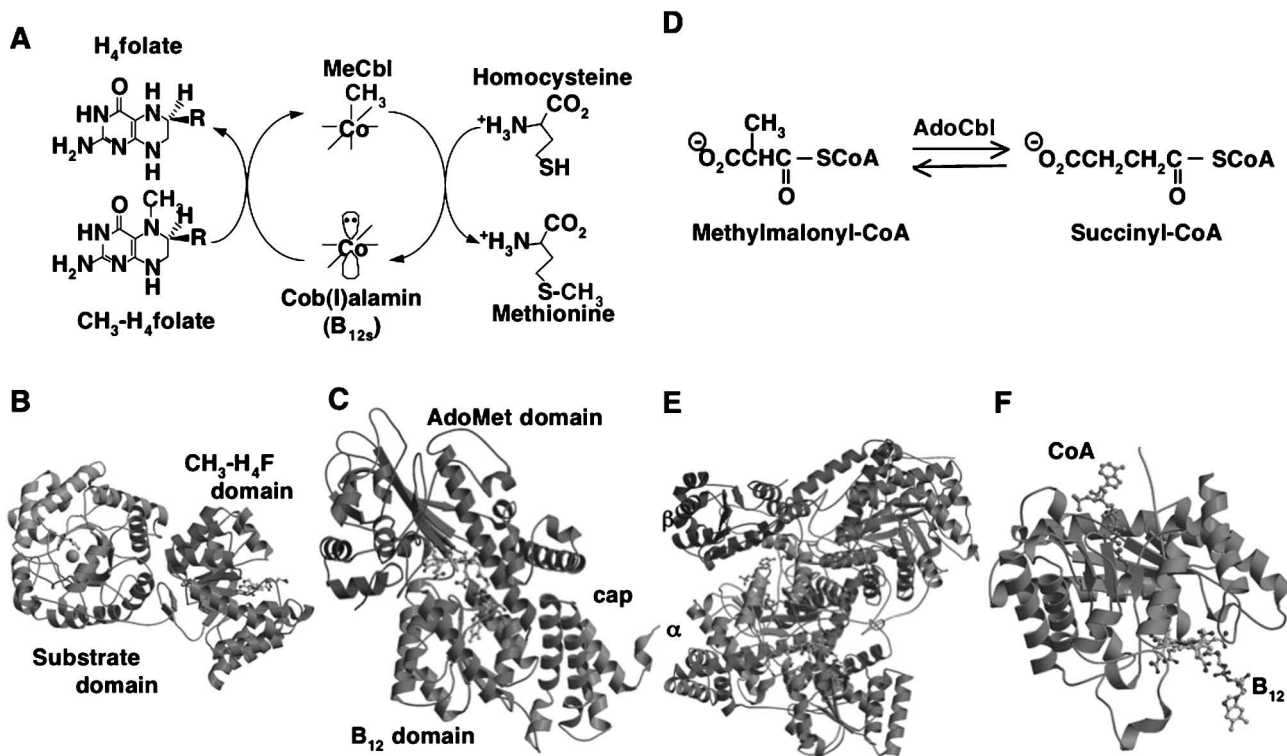


Fig. 4. Mammalian B<sub>12</sub> Enzymes

Reaction (A) and structures of N-terminal (B) and C-terminal (C) regions of methionine synthase. Reaction (D), overall structure (E), and  $\alpha$  subunit structure (F) of methylmalonyl-CoA mutase.

明されていないが、細菌酵素はN末端側半分とC末端側半分の構造が解かれている。<sup>7,8)</sup> N末端側には基質ホモシステインとメチルテトラヒドロ葉酸の結合部位があり [Fig. 4(B)], C末端側には B<sub>12</sub> 結合ドメインと不活性化を受けたときの再活性化に関与する S-アデノシルメチオニン (AdoMet) の結合部位がある [Fig. 4(C)]. 酵素は、最強の求核反応剤と言われる B<sub>12a</sub> すなわち 1 価コバルトを含む B<sub>12</sub> の高い反応性を触媒に利用している。

ヒトが持つ B<sub>12</sub> 酵素の 2 つ目は、メチルマロニル CoA ムターゼ (MCM) である。この酵素はメチルマロニル CoA とスクシニル CoA との間の炭素骨格組換え反応を触媒する [Fig. 4(D)].<sup>9)</sup> この反応では、アデノシル B<sub>12</sub> が補酵素となり、その Co-C 結合がホモリシスして反応はラジカル機構で進行する。この酵素の機能不全により、メチルマロン酸尿症の症状が出る。動物の酵素はまだ立体構造が解明されていないが、細菌の本酵素は全立体構造が明らかになっており [Figs. 4(E) and (F)],<sup>10)</sup> 反応機構も微生物酵素で詳細に研究されてきた。<sup>9)</sup>

ヒトが持つ B<sub>12</sub> 酵素は以上の 2 つであるが、微生物

物ではほかの B<sub>12</sub> 酵素も知られている。われわれが研究しているジオールデヒドラターゼ (DD), グリセロールデヒドラターゼ (GD), エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) はアデノシル B<sub>12</sub> 関与酵素で、それぞれ 1,2-プロパンジオールやグリセロールの脱水反応 [Fig. 5(A)], エタノールアミンの脱アンモニア反応 [Fig. 5(C)] を触媒する。<sup>11)</sup> われわれが解明してきた立体構造を Fig. 5 に示した。(B) がジオールデヒドラターゼ, (D) がエタノールアミンアンモニアリアーゼである。<sup>12,13)</sup> グリセロールデヒドラターゼの構造はここには示していないが、ジオールデヒドラターゼの構造とよく似ている。<sup>14)</sup> ジオールデヒドラターゼにおいて、基質が配位している金属イオンは最近 Ca<sup>2+</sup> と同定された。<sup>15)</sup>

アデノシル B<sub>12</sub> 関与の酵素反応は、Fig. 6(A) に示す一般式で表される分子内基転位反応であり、共通の最小機構が確立されている [Fig. 6(B)].<sup>16)</sup> まず補酵素がアポ酵素に結合するとその Co-C 炭素結合が活性化され、そこに基質がくると、Co-C 結合は速やかにホモリシスしてアデノシルラジカルが生

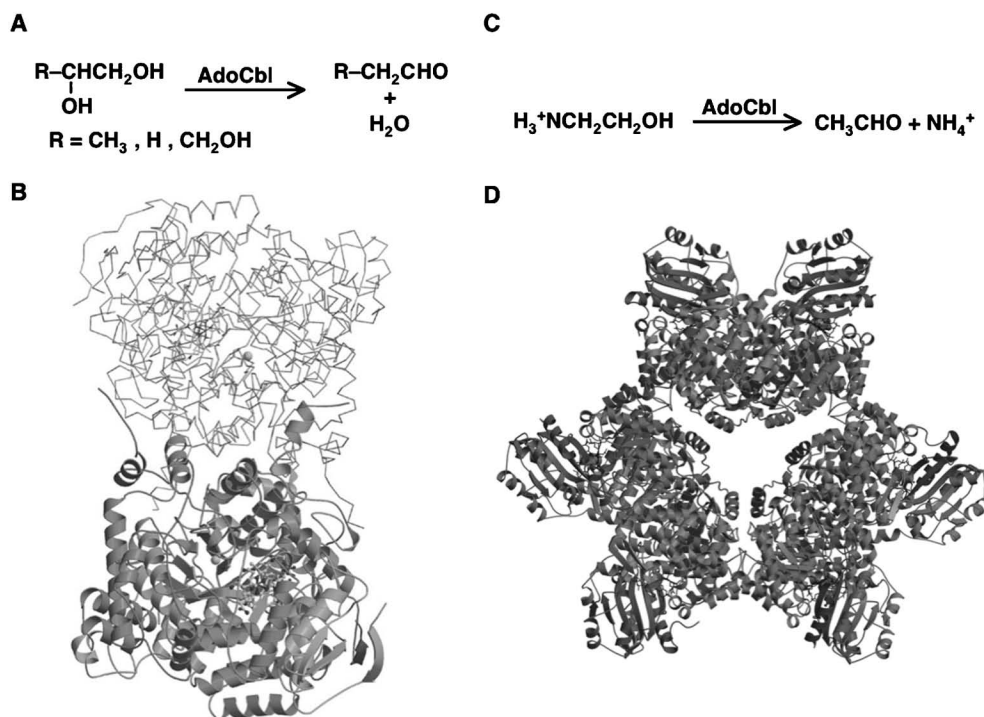


Fig. 5. Microbial B<sub>12</sub> enzymes  
Reactions and overall structures of diol dehydratase (A, B) and ethanolamine ammonia-lyase (C, D).

じる。これが基質の1位の水素を水素原子として引き抜き、基質ラジカルと5'-デオキシアデノシン(5'-dAdo)が生成する。基質ラジカルは基Xが2位から1位に移動して生成物ラジカルとなった後、5'-dAdoから水素原子を引き抜き返して生成物となり、アデノシルラジカルが再生される。アデノシルラジカルは2価コバルト種と結合して補酵素を再生する。われわれが提案しているジオールデヒドラターゼの精密反応機構をFig. 6(C)に示した。<sup>11)</sup>まず基質プロパンジオールがくると、ホロ酵素の金属イオンに配位していた2つの水分子が置換され、酵素タンパク質のコンホメーション変化が起こる。その結果、restingの状態ですでに不安定化されていた補酵素のCo-C結合がさらに活性化されてアデノシルラジカルと2価コバルト種を生成する。アデノシルラジカルのリボース部分がグリコシド結合を軸に回転することにより、5'炭素がS体基質ではpro-S水素に近づき、これを水素原子として引き抜いて、基質ラジカルと5'-dAdoとなる。これにより、より安定なラジカルが生じるため、平衡が一気に開裂側にシフトする。基質ラジカルは環状の遷移状態を経由する協奏経路により水酸基が2位から1位へ移動して生成物ラジカルとなる。その際、水素結合は

強いのでその位置は変わらず、むしろ炭素骨格がS体基質では反時計回りに回転すると考えられる。次に、今度は1,1-ジオールラジカルのラジカル中心である2位の炭素が5'-dAdoの5'-メチル基に近づき、水素原子を引き抜き返して1,1-ジオールとアデノシルラジカルを生じる。1,1-ジオールは脱水されて、生成物プロピオンアルデヒドとなり、水分子により置換されて活性部位から解離する。その結果、酵素は基質フリー型のコンホメーションに戻り、2価コバルトとアデノシルラジカルの再結合が起こって、補酵素が再生される。Co-C結合再生により結合エネルギーが放出されるため、これらの最終過程が保証され、反応が完結すると考えられる。このように、アデノシルB<sub>12</sub>関与の酵素は化学的に起こり難い反応を、超活性種であるラジカルの高い反応性を利用して触媒していることが特徴である。

#### 4. B<sub>12</sub> 酵素の活性維持システムと再活性化タンパク質

B<sub>12</sub> 酵素は超活性種を触媒に利用しているため、副反応により不活性化され易いが、生物は活性維持システムを持つことが分かってきた。メチオニンシンターゼの場合、酵素は約1700回の触媒回転後に不活性化される。<sup>6,17)</sup>これは、超活性種であるB<sub>12s</sub>

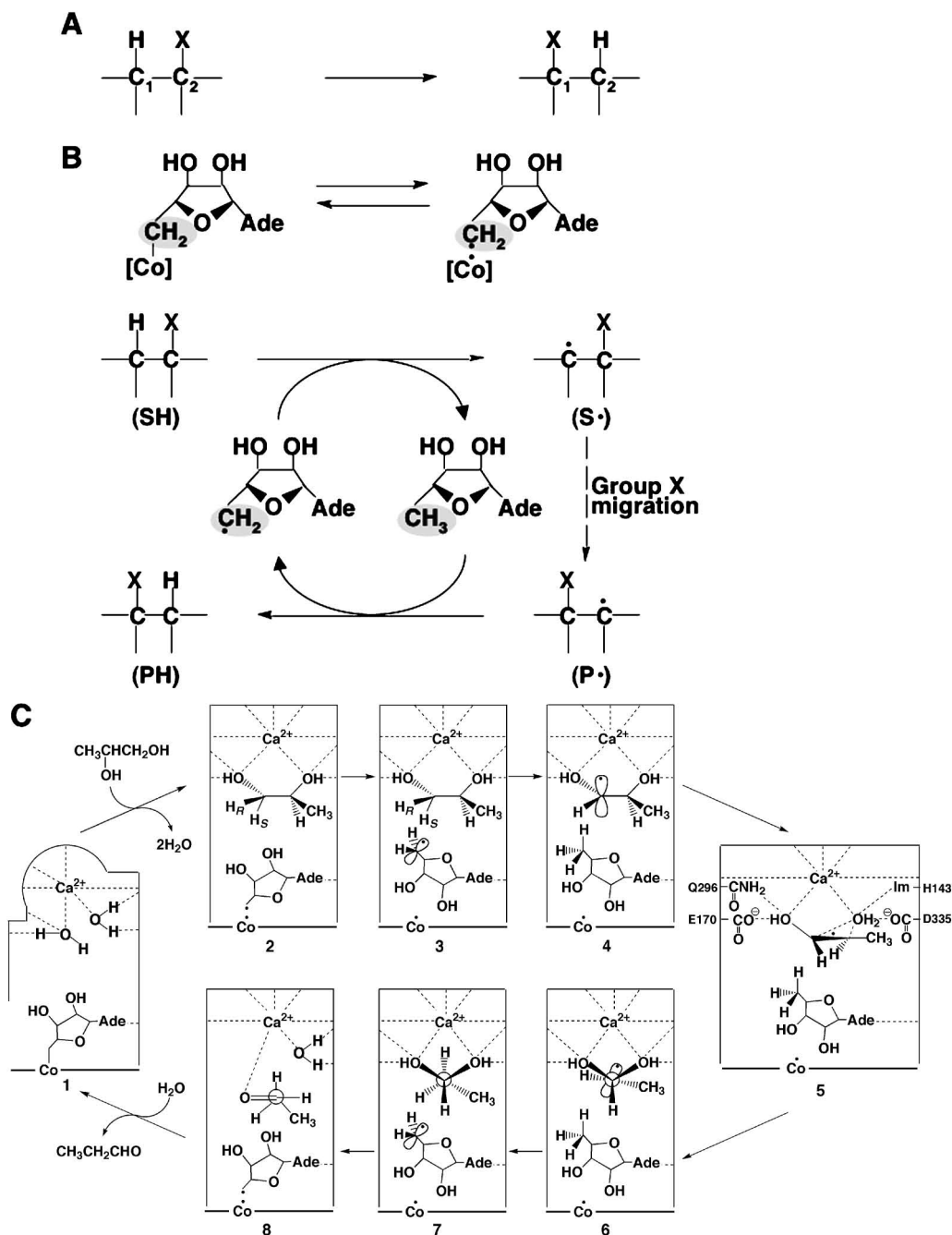


Fig. 6. AdoCbl-dependent Rearrangements

Common feature (A), minimal mechanism (B), and refined mechanism (C) for diol dehydratase. Only the reaction with (S)-1,2-propanediol is shown. For the reaction with the (R)-enantiomer, see ref. 11.

が酸化を受け易いためである。大腸菌の酵素では、フラボドキシソという FMN タンパク質とフラボドキシソレダクターゼという FAD タンパク質からなる還元系が働くことにより、 $B_{12s}$  が再生し、Ado-Met によりメチル化されて酵素活性を回復することが分かっていた (Fig. 7)。<sup>18)</sup> 動物はこれらの還元系を持っていないが、Gravel (加) らは動物では FMN と FAD の両方を含むジフラビンレダクター

ゼが関与しているという予測をたて、再活性化タンパク質であるメチオニンシンターゼレダクターゼ (MSR) の遺伝子をクローン化することに成功した。<sup>19)</sup> これは Fig. 3 (A) の *cbIE* の産物に相当する。

では、アデノシル  $B_{12}$  関与酵素の場合はどうか。ジオールデヒドラターゼは基質によっては反応中に速やかな不活性化を受ける。<sup>20)</sup> 典型的な例はグリセロールで、これはよい基質であると同時に

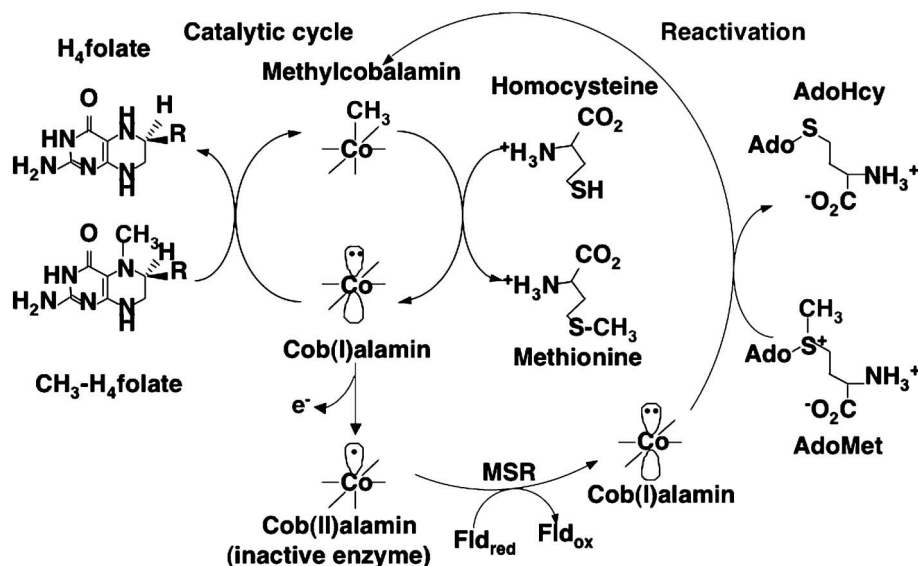


Fig. 7. Reactivation of Methionine Synthase by Methionine Synthase Reductase

に、強力な不活性化剤としても挙動する。エタノールアミンアンモニアラーゼの場合も同様で、基質エタノールアミンにより速やかに不活性化される。これらの不活性化は、いずれも機構依存的な不活性化の1種で、副反応によりラジカルが消滅して起こる [Fig. 8(A)]. その結果、補酵素は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から離れないために不活性化が起こるわけである。<sup>11)</sup> これらの酵素が本来の基質によりなぜ不活性化されるのか、生理的には大きな謎であった。細胞内では不活性化が起こらないか、あるいは不活性化が起こっても速やかに再活性化されるのではないかと考えて調べた結果、細胞内でも不活性化は起こるが、不活性化されたホロ酵素をATP依存的に再活性化する系があることを見出した。<sup>21)</sup> この再活性化にタンパク質因子が関与することをつきとめ、これをジオールデヒドラターゼ再活性化因子(DDR)と名付けた。<sup>22)</sup> その後、グリセロールデヒドラターゼ及びエタノールアミンアンモニアラーゼの再活性化因子も発見し、これらをDDRにならって、GDR, EALRと名付けた。<sup>23,24)</sup> これらの機能をまとめると Fig. 8(B)のようになる。DDRは、不活性化されたホロ酵素からATP依存的に損傷コファクターを解離させてアポ酵素を生じ、これ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とが分かった。<sup>25)</sup>

これらの再活性化因子と大腸菌 DnaK やヒト

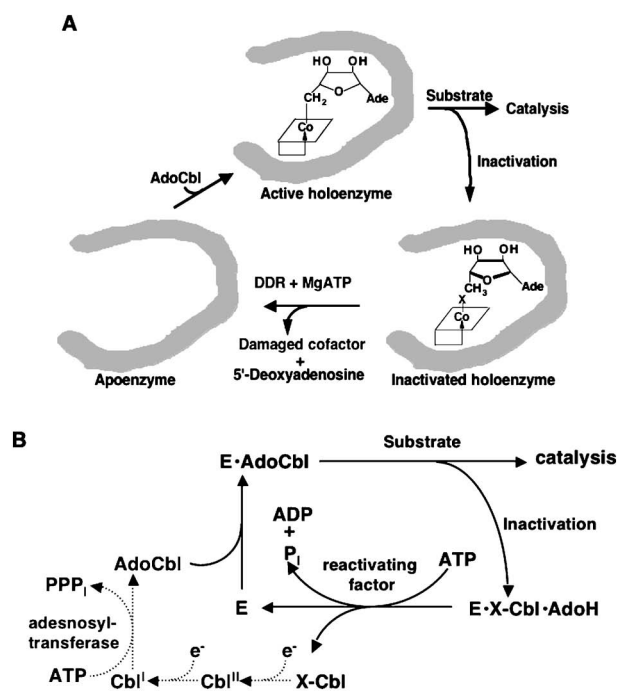


Fig. 8. Reactivation of Inactivated  $B_{12}$  Enzymes (A) and Necessity of Coenzyme Recycling (B)  
X-Cbl, a damaged cofactor.

HSP70など、ヒートショックタンパク質70ファミリーの分子シャペロンのアミノ酸配列とを比較すると、全体的なホモロジーはないが、局所的にホモロジーの高い領域が3カ所認められた [Fig. 9(A)]. これらの領域をHSP70のATPaseドメインの立体構造にマッピングすると、これらはADP結合領域

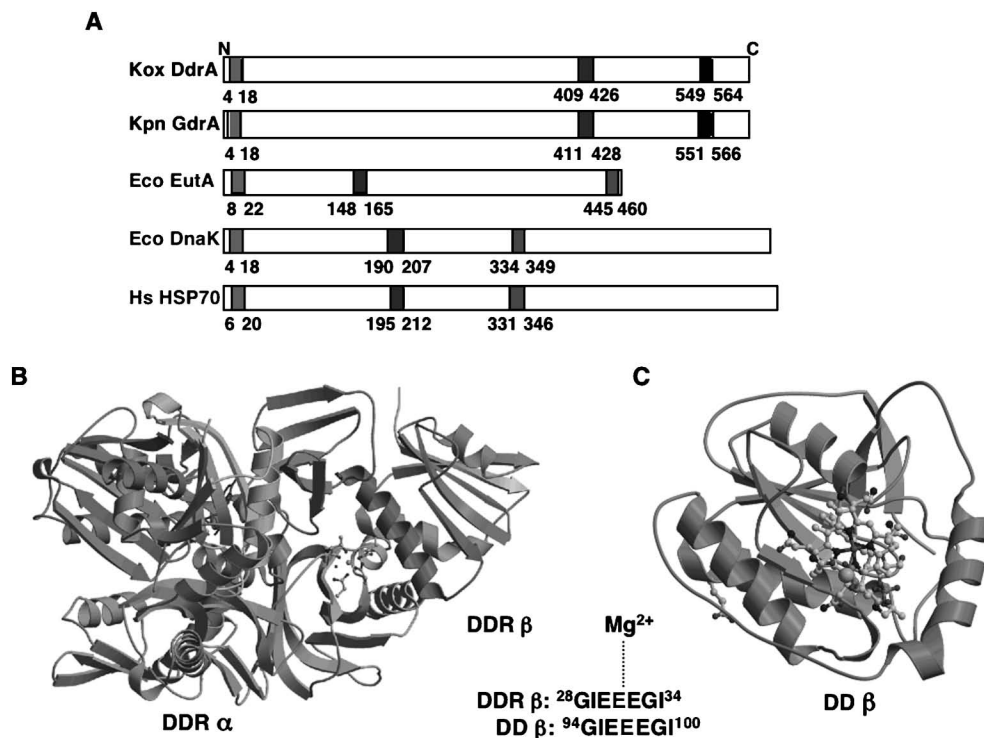


Fig. 9. Reactivating Factors for B<sub>12</sub> Enzymes

Fragmentary homologies with molecular chaperones (A), structure of diol dehydratase-reactivating factor (B), and its similarity with the enzyme  $\beta$  subunit (C).

の3つのループに対応していた。このことから、B<sub>12</sub>酵素再活性化因子とHSP70ファミリー分子シャペロンとの間で、ヌクレオチドスイッチが保存されており、共通のスイッチ機構を持つことが示唆された。このことを立証すべく、DDRの結晶構造解析を行った。ここではDDRの半分の構造を示してある [Fig. 9(B)].<sup>26)</sup> ATPaseドメインは期待通り、HSP70と同様のフォールドを持っていた。興味深いことに、DDRの $\beta$ サブユニットと酵素の $\beta$ サブユニットは類似したフォールドを持っている。また、DDRでは3つの連続したGlu残基の真ん中のものがサブユニット界面のMg<sup>2+</sup>イオンに配位しているが、その周辺も含めたアミノ酸配列が酵素の $\beta$ サブユニットにも保存されている。このことから、DDRの $\beta$ サブユニット [Fig. 9(B)] が酵素の $\beta$ サブユニット [Fig. 9(C)] 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、実際にそのことが生化学実験により確認できた [Fig. 10(A)].<sup>26)</sup>

そこで、酵素とDDRの立体構造から両者の複合体のドッキングモデルを構築してみた。DDR $\beta$ サブユニットに酵素の $\beta$ サブユニットを重ね合わせ

ると、Fig. 10(B)のような複合体が形成されることになる。注目すべきは、この複合体において、双頭の矢印で示した箇所で酵素とDDRの $\alpha$ サブユニット同士の間には大きな立体反発が誘起されることである。この立体反発により、酵素の $\alpha$ サブユニットが $\beta$ サブユニットに関して傾く結果、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。<sup>26)</sup> 実際には、損傷補酵素が活性部位から抜け出てくる隙間があるかという疑問が生じるが、酵素の $\alpha$ と $\beta$ サブユニットの間には幅15 Å、高さ5 Å程度の隙間がある [Fig. 10(C)]. さらにDDRによって $\alpha$ サブユニットが $\beta$ サブユニットに対して傾くことで6 Å程度動くとするれば、アデニン部を失った損傷補酵素はこの隙間からちょうど抜け出てこれるのではないかと想像される。<sup>13,27)</sup>

Figure 8(B)に示したように、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、系中の補酵素がすべて損傷を受けたらどうなるのであろうか。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アデノシル化してアデノシルB<sub>12</sub>を再生する、換言すれば、補酵素をリサイクルしなければ完全な物質収支



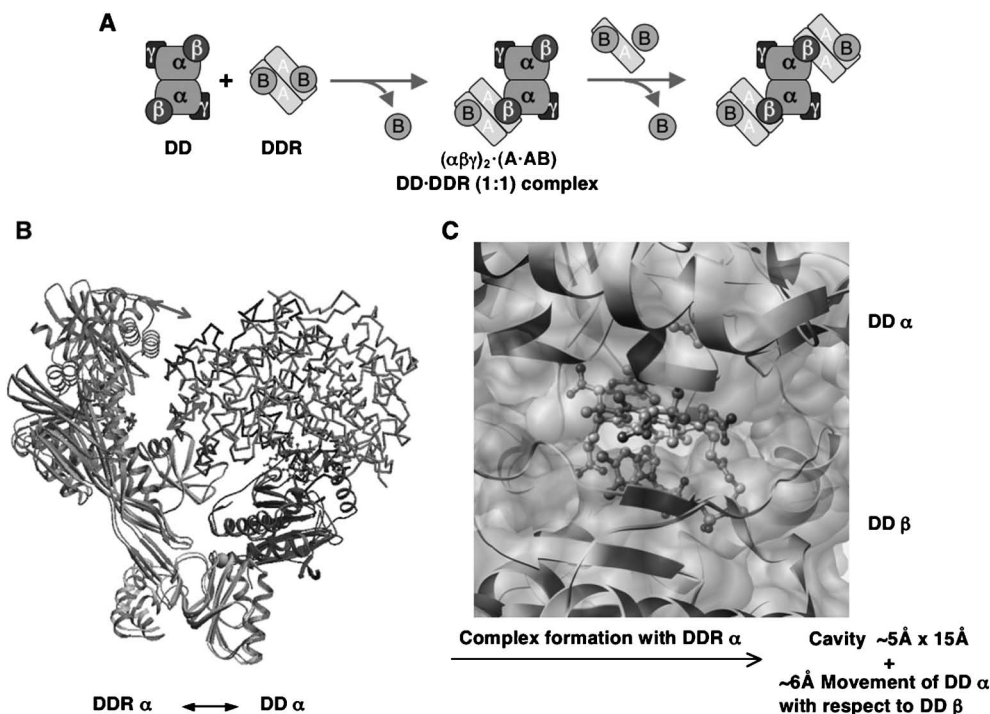


Fig. 10. Mechanism of Action of Diol Dehydratase-reactivating Factor  
Subunit swapping with enzyme (A), modeled complex (B), and postulated gap for B<sub>12</sub> release (C).

は成り立たないことが明らかである [Fig. 8(B)]. この過程には、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2つの酵素が関与するので、これら補酵素再生系タンパク質も B<sub>12</sub> 酵素の活性維持システムの構成メンバーである可能性が考えられるが、分子レベルでの相互作用の検出については今後の研究課題である。

### 5. おわりに

酵素は生体内に単独で存在するわけではなく、システムの一員として生理機能を発揮している。したがって、筆者は「酵素をシステムとして理解する」システム酵素学の研究がこれから先、新しい酵素の応用技術や医薬品を開発する上で極めて重要であると考えている。冒頭で紹介した代謝異常症患者の遺伝子変異を8つの相補群に分けたときの各遺伝子の産物は、微生物システムとの比較から、いくつかについては機能が判明し、B<sub>12</sub> 代謝システムがヒトと微生物とで非常によく似ていることが分かってきた。最近、ある種の細菌の MeaB タンパク質がメチルマロニル CoA ムターゼ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>28)</sup> これは動物の MMAA タンパク質すなわち *cbIa* タンパク質と高い相同性を示すことから、

MMAA が動物メチルマロニル CoA ムターゼの再活性化因子である可能性が考えられる。そうならば、動物の2つの B<sub>12</sub> 酵素はどちらも再活性化タンパク質を持つことになる。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からなる補酵素再生系タンパク質が B<sub>12</sub> 酵素の活性維持システムを構成している可能性も含めて、ヒトの細胞内 B<sub>12</sub> 輸送と代謝システムの全貌が近い将来に解明されることが期待される。本稿で述べてきたように、研究は微生物システムの方がはるかに進んでおり、また酵素本体の構造と機能の研究も微生物酵素で進んでいるので、構造に基づく精密な活性制御法の開発も微生物酵素で進展すると考えられる。したがって、その成果は適切にフィードバックさせることにより、ヒトの代謝異常症の治療に有効な薬剤の開発に役立つと考えられる。

**謝辞** 本研究に引用した筆者らの研究のうち、X線結晶構造解析は姫路工大安岡教授及び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の成果であり、ほかは岡山大学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。ご協力頂いた共同研究者の方々に厚くお礼を申し上げます。

ます.

### REFERENCES

- 1) Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., *Science*, **107**, 396–397 (1948).
- 2) Smith E. L., Karker L. F. J., *Biochem. J.*, **43**, viii (1948).
- 3) Barker H. A., Weissbach H., Smyth R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 1093–1097 (1958).
- 4) Alpers D. H., Russell-Jones G. J., “Intrinsic Factor, Haptocorrin, and Their Receptors, Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>,” ed. by Banerjee R., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, pp. 411–440.
- 5) Gravel R. A., Mahoney M. J., Ruddle F. H., Rosenberg L. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3181–3185 (1975).
- 6) Matthews R. G., “Cobalamin-dependent Methionine Synthase, Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>,” ed. by Banerjee R., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, pp. 681–706.
- 7) Evans J. C., Huddler D. P., Hilgers M. T., Romanchuk G., Matthews R. G., Ludwig M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3729–3736 (2004).
- 8) Bandarian V., Patridge K. A., Lennon B. W., Huddler D. P., Matthews R. G., Ludwig M. L., *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 53–56 (2002).
- 9) Banerjee R., *Chem. Rev.*, **103**, 2083–2094 (2003).
- 10) Mancia F., Keep N. H., Nakagawa A., Leadlay P. F., McSweeney S., Rasmussen B., Böecke P., Diat O., Evans P. R., *Structure*, **4**, 339–350 (1996).
- 11) Toraya T., *Chem. Rev.*, **103**, 2095–2127 (2003).
- 12) Shibata N., Masuda J., Tobimatsu T., Toraya T., Suto K., Morimoto Y., Yasuoka N., *Structure*, **7**, 997–1008 (1999).
- 13) Shibata N., Tamagaki H., Hieda N., Akita K., Komori H., Shomura Y., Terawaki S., Mori K., Yasuoka N., Higuchi Y., Toraya T., *J. Biol. Chem.*, **285**, 26484–26493 (2010).
- 14) 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., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4484–4494 (2002).
- 15) Toraya T., Honda S., Mori K., *Biochemistry*, **49**, 7210–7217 (2010).
- 16) Abeles R. H., “Current Status of the Mechanism of Action of B<sub>12</sub> Coenzymes, Vitamin B<sub>12</sub>,” eds. by Zagalak B., Friedrich W., Walter de Gruyter, Berlin, 1979, pp. 373–388.
- 17) Yamada K., Yamada S., Tobimatsu T., Toraya T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 35571–35576 (1999).
- 18) Fujii K., Huennekens F. M., *J. Biol. Chem.*, **249**, 6745–6753 (1974).
- 19) 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., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3059–3064 (1998).
- 20) Toraya T., Shirakashi T., Kosuga, T., Fukui S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 475–481 (1976).
- 21) Honda S., Toraya T., Fukui S., *J. Bacteriol.*, **143**, 1458–1465 (1980).
- 22) Toraya T., Mori K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 3372–3377 (1999).
- 23) Kajiura N., Mori K., Tobimatsu T., Toraya T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 36514–36519 (2001).
- 24) Mori K., Bando R., Hieda N., Toraya T., *J. Bacteriol.*, **186**, 6845–6854 (2004).
- 25) Mori K., Toraya T., *Biochemistry*, **38**, 13170–13178 (1999).
- 26) Shibata N., Mori K., Hieda N., Higuchi Y., Yamanishi M., Toraya T., *Structure*, **13**, 1745–1754 (2005).
- 27) Mori K., Hosokawa Y., Yoshinaga T., Toraya T., *FEBS J.* (in press)
- 28) Padovani D., Banerjee R., *Biochemistry*, **45**, 9300–9306 (2006).