細菌の含硫、含セレンアミノ酸代謝関連酵素の 新しい機能と応用†

(1989 年度農芸化学奨励賞受賞)

江 崎 信 芳

(京都大学化学研究所)

含硫化合物は一般に反応性が高く、とくに含硫アミノ酸は微生物においてユニークな酵素反応に関与している。一方、硫黄と同族のセレンは、細菌や哺乳類の必須微量元素であり、含セレン化合物はきわめて特徴的な生理活性を示す。筆者らは、化学的性質の酷似するこれら2元素の生体内反応性を対比しながら、細菌における含硫、含セレンアミノ酸代謝関連酵素の機能や構造、および反応機構を明らかにするとともに、これら諸酵素の新しい応用面を開発した。

I. 細菌の L-メチオニン γ-リアーゼ

1. 分布と酵素化学的性質

メチオニンからのメタンチオール生成については2つの経路がある。そのひとつはメチオニンがまず酸化的に脱アミノされ、次いで脱チオメチルされる経路である。もうひとつはメチオニンが同時に脱アミノおよび脱チオメチルを受けてメタンチオールを生成する経路である。後者の経路は 1938 年に Onitake⁽¹⁾ によって *E. coli* ならびに *Proteus vulgaris* の乾燥菌体を用いた研究で初めて指摘された。その後、メチオニンからメタンチオール、アンモニアおよび α-ケト酪酸の生成する反応を触媒する酵素がメチオニナーゼ (L-メチオニン γ-リアーゼ (EC 4.4.1.11)) と命名された⁽²⁾。本酵素は土壌細菌、*Pseudomonas* 属細菌、*Clostridium* 属細菌などにも見出されたが、酵素化学的な面での詳細な研究は行われていなかった。筆者らは細菌における本酵素の分布を明らかにするために、酵素活性の測定に際し、反応を好

気条件下とツンベルク管中窒素雰囲気下にてメチオニンを脱アミノする *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Alkaligenes*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Proteus* および *Brevibacterium* のうち、*Ps. putida*, *Ps. taetrolens* および *Ps. desmolytica* のみが嫌気条件下にても L-メチオニンを脱アミノすることが明らかになった⁽³⁾。筆者らはこれらの菌株のなかでもっとも活性の高い *Ps. putida* (ICR 3460) より本酵素を精製結晶化し、酵素化学的諸性質を明らかにした⁽⁴⁾。

本酵素の分子量は約 173,000、同一のサブユニット4個から構成され、各サブユニットにピリドキサルリン酸1モルが酵素タンパク質のリジン残基とのシッフ塩基を介して結合している。この酵素によってメチオニン以外の種々のホモシステインおよびシステイン誘導体も分解を受けて、それぞれ α-ケト酪酸およびピルビン酸を生成するとともに、アンモニアならびにチオールを生じる。つまり、本酵素は L 型含硫アミノ酸の α, γ-脱離だけでなく、α, β-脱離をも触媒する。

2. 置換反応

本酵素は反応系にエタンチオールなどのチオールが存在すると、(1) 式のように γ-置換を触媒してエチオニンを合成する。

生成したエチオニンも、当然、本酵素の α, γ-脱離を受けて分解するので、エタンチオールを逐次添加すると収量は増大し、最適条件下ではメチオニンに対して約 95% の収量でエチオニンを合成しうる。メチオニン以外の α, γ-脱離における基質（たとえば、メチオニンスルホンやホモシステイン）を用いた場合にも同様にエチ

† Bacterial Enzymes Participating in Sulfur and Selenium Amino Acid Metabolism: New Functions and Applications.

Nobuyoshi ESAKI (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji 611)

表1 メチオニンと各種チオールからの S-置換ホモシステインの合成反応における相対速度

RSH, R=	相 対 速 度	RSH, R=	相 対 速 度
エチル	100	<i>n</i> -ヘキシル	17
<i>n</i> -プロピル	81	<i>tert</i> -ヘプチル	5
<i>iso</i> -プロピル	38	<i>n</i> -ヘプチル	4
<i>n</i> -ブチル	43	<i>tert</i> -ヘプチル	0
<i>iso</i> -ブチル	75	<i>n</i> -オクチル	0
<i>sec</i> -ブチル	27	<i>tert</i> -オクチル	0
<i>tert</i> -ブチル	26	<i>tert</i> -ノニル	0
<i>n</i> -ペンチル	43	<i>n</i> -デシル	0
<i>iso</i> -ペンチル	52	ベンジル	71
<i>sec</i> -ペンチル	12	フェニル	43
<i>tert</i> -ヘキシル	9	β -ナフチル	6

オニンを合成できる。また、システインおよびその類縁体を基質にした反応系では、 β -置換反応により S-エチルシステインを合成しうる (式 (2))。

エタンチオール以外にも炭素鎖が3~7のアルカンチオールの各種構造異性体や芳香族のベンゼンチオールあるいは β -ナフタレンチオールも置換基供与体として作

用する。しかし、炭素数が8以上のアルカンチオールは基質にならない (表1)。その他、 β -メルカプトエタノールやシステアミンなど種々のエタンチオール誘導体も基質となって、対応する S-置換ホモシステインあるいは S-置換システインを生成する。しかし、カルボキシル基やアミノ基のような解離基を S-置換部に持つチオールの反応性は低い。

このように L-メチオニン γ -リアーゼが含硫アミノ酸の脱離反応と置換反応を触媒する機構を図1に示してある。基質含硫アミノ酸がホロ酵素の結合ピリドキサルリン酸と反応して、アルバドイミン転移を起こして補酵素-基質アルダミンを生成し、プロトンが付加したピリジン窒素およびイミン窒素の電子吸引性によって基質の α -プロトンが脱離し、ケトイミン中間体 (1) を生じる。チオール部分の脱離によってビニルグリシンのケトイミン中間体 (3) が形成され、アミノクロトン酸のアルドイミン中間体を經由して加水分解が起こればアンモニアと α -ケト酪酸を生じて α, γ -脱離が終結する。一方、中間体 (3) の β, γ 間の二重結合に別のチオールが付加すると新しい S-置換システイン (4) が合成される (γ -置換反応)。

3. ビニルグリシンとの反応性

このような反応機構に基づけば、本酵素はビニルグリ

図1 L-メチオニン γ -リアーゼの触媒する含硫アミノ酸の α, γ -脱離、 γ -置換ならびにビニルグリシンの脱アミノおよび γ -付加の反応機構

シンの脱アミノ反応 (式 3) および γ -付加反応 (式 4) を触媒するはずである。

事実, 本酵素の作用によってビニルグリシンから α -ケト酪酸とアンモニアの化学量論的生成が確認された⁽⁵⁾。さらに, *n*-プロパンチオールを添加した反応系においては *S*-*n*-プロピルホモシステインの生成が証明された⁽⁵⁾。ビニルグリシンと他のチオールからも相当する *S*-置換ホモシステインが生成する。 γ -付加反応におけるこれらのチオールの反応速度比は, メチオニンの γ -置換反応における反応速度比と近似している。本酵素は α, γ -脱離反応においてメチオニンに最も高い親和性を示すが, その他の *K_m* 値, *V_{max}* 値には大きな差は認められない。ビニルグリシンはアスパラギン酸トランスアミナーゼなどの自殺基質として使用するが, 本酵素に対してはまったく不活性化作用を及ぼさない。

4. 含セレンアミノ酸およびセレノールとの反応性

L-メチオニン γ -リアーゼはセレノメチオニンの α, γ -脱離反応をも触媒する (式 5)。メタンセレノールは空気酸化を受けてジメチルジセレニドに変化する⁽⁶⁾。

セレノメチオニンに対する *K_m* 値は 0.51 mM で, メチオニンに対する値 (1.3 mM) より低い。その *V_{max}* 値もメチオニンに対する値の 1.2 倍ときわめて高い反応性を示す。さらに本酵素はセレノメチオニンと各種チオールの間の γ -置換反応も触媒して, チオールに対応する *S*-置換ホモシステインを合成する⁽⁶⁾。

合成反応として高い意義を持つのは, メチオニンあるいはその類縁体と種々のセレノールの間の γ -置換反応である。たとえば, メチオニンまたはメチオニンスルホンとメタンセレノール, ペンゼンセレノールあるいは *n*-ヘキサンセレノールからそれぞれ酵素的にセレノメチオニン, *Se*-フェニルセレノホモシステイン, *Se*-*n*-ヘキシルセレノホモシステインが生成する (式 6)。メチオ

ニンに対する γ -置換反応において, チオールの反応性は一般にセレノールよりも高い。また, 本酵素は含硫アミノ酸とセレノールの間の β -置換をも触媒するので, 同様の手法で脂肪族, 芳香族の種々のセレノシステインおよびその誘導体を容易に合成しうる。

5. 重水中における基質水素重水素置換反応

L-メチオニンを L-メチオニン γ -リアーゼとともに重水中でインキュベートすると, 反応の初期において α 位および β 位のプロトンシングナルが三重線から一重線に変化する⁽⁷⁾。この間, 脱離反応による α -ケト酪酸の生成はほとんど認められず, これらのプロトンシングナルの変化は L-メチオニンの重水素置換に基づく。立体化学的に不等価な β 位水素はともに重水素化され, $[\alpha\text{-}^2\text{H}, \beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -L-メチオニンに変化する。この重水素置換反応の速度は大きく, α 位水素は本来の脱離反応の約 40 倍の速度で重水素化される。一方, 生成した $[\alpha\text{-}^2\text{H}, \beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -L-メチオニンは 1 次同位体効果により, その酵素的脱離反応はきわめて遅い。したがって, この酵素反応により 81% の収率で L-メチオニンの上記標識体を調整できる。*S*-メチル-L-システイン, *O*-エチルホモセリン, セレノメチオニンなども α 位および β 位が重水素化されるが, メチオニンスルホン, トリフルオロメチオニン, *O*-アセチルホモセリン, *S*-メチルメチオニンなどの γ 位に良好な脱離基を持つ基質は重水素化されない。L-アラニン, L- α -アミノ酪酸, L-ノルバリン, L-ノルロイシンなどの直鎖アミノ酸は本酵素により脱離反応も置換反応も受けないが, L-メチオニンおよび *S*-メチル-L-システインの脱離反応とともに拮抗的に阻害する。これらのアミノ酸を酵素と重水中でインキュベートすると, メチオニンなどの場合と同様に α 位および β 位において重水素置換される。また, グリシン, L-フェニルアラニン, L-トリプトファンなどにおいても, 反応速度は小さいけれども α 位が重水化される。グリシンは 2 個の α -プロトンのうち pro-S プロトンのみが特異的に重水素置換される。このことは, L 体のみに作用する本酵素の立体特異性とよく一致している。一方, 分岐鎖アミノ酸, 酸性アミノ酸, 塩基性アミノは本酵素によって重水素置換を受けない。*S*-(β -アミノエチル)-L-システインはリジンのアナログであり, リジンと同様に本酵素による重水素置換を受けない。しかし, *S*-(β -*N*-アセチルアミノエチル)-L-システインは本酵素によって α 位が重水化される。

図 2 L-メチオニン γ -リアーゼの触媒する基質水素-重水素置換反応の機構

上述した重水素置換を受けるアミノ酸は同じように三重水素によっても標識される。標識位置も α および β 位であり、メチオニン、S-メチルシステイン、グリシン、 α -アミノ酪酸、ノルバリンの三重水素標識標品が調製された⁽⁹⁾。 *Pseudomonas putida* の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼとその基質になる L- または D- 型のメチオニン、エチオニンなどを重水中でインキュベートするとラセミ化とともに α 位が標識される。また上述の方法で調製された [α - ^2H , β - $^2\text{H}_2$]-アミノ酸を軽水中でアミノ酸ラセマーゼと反応させると [β - $^2\text{H}_2$]-アミノ酸が調製される。このように L-メチオニン γ -リアーゼ単独あるいはアミル酸ラセマーゼとの協同でいろいろなアミノ酸を特定の位置で重水素、あるいは三重水素化することができる。

本酵素の触媒する α および β -プロトンの重水素（あるいは三重水素）置換の機構を図 2 に示してある⁽⁹⁾。酵素-補酵素シッフ塩基 (I) から基質-補酵素シッフ塩基 (II) にアルドイミン転移した後、活性中心の塩基性残基によって α -プロトンが引き抜かれ、 α -カルバニオン中間体が生成する。塩基性残基に引き抜かれたプロトンが溶媒の重水素と置換し、 α -カルバニオン中間体にその重水素が付加されると、 α 位のみが重水素化されたアミノ酸が生成する。一方、 β -プロトンの置換はケチミン中間体 (IV) とエナミン中間体 (V) の間の互変を繰り返す間に、塩基性残基に引き抜かれた β -プロトンが溶

媒の重水素と置換し、反応が逆方向に進めば α 位と β 位がともに重水素化されたアミノ酸が生成すると考えられる。

6. 酵素自殺基質反応

筆者らは酵素自殺基質を用いてさらに詳細に本酵素の触媒機構を調べた。S-(N-メチルチオカルバモイル)-L-システイン⁽⁹⁾のほか、2-アミノ-4-クロロ-4-ペンテン酸⁽¹⁰⁾によって不活性化される。活性中心のシステイン残基⁽¹¹⁾が本不活性化反応の過程で修飾されることを実証した⁽¹⁰⁾。

II. L-セレノシステイン β -リアーゼ

1. 分布と酵素化学的諸性質

筆者らはラット肝臓におけるセレノシステインの生合成経路について検証を加え、L-セリンと L-セレノホモシステインから L-セレノシスタチオンを経由して L-セレノシステインが生合成されることを初めて実証した⁽¹²⁾。その過程でラット肝臓抽出液中に L-セレノシステインを分解する酵素の存在を見出した⁽¹³⁾。すなわち、DL-セレノシステインをラット肝臓抽出液とともにインキュベートすると、アラニンとセレン化水素が生成することを見出した。生成したアラニンはアラニン脱水素酵素とは反応するが D-アミノ酸酸化酵素とは反応しないので L-異性体である。一方、未反応のセレノシステインは D-アミノ酸酸化酵素によってほぼ全量酸化されるの

で D-異性体である。したがってラット肝臓抽出液中には L-セレノシステインに作用し, L-アラニンとセレン化水素に分解する酵素が存在する。筆者らはこの新酵素をセレノシステイン β -リアーゼと命名した⁽¹³⁾。本酵素は各種の動物臓器に広く分布している。肝臓と脾臓には一般に高い活性が存在するが, 脂肪組織や血液には活性は認められない。筆者らはブタ肝臓より本酵素を精製した⁽¹³⁾。精製酵素にはシスタチオニン γ -リアーゼ, シスタチオニン β -シンターゼ, セリンデヒドラターゼ, システインリアーゼ, アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼ, キヌレニナーゼ, アラニンアミノトランスフェラーゼ, セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの活性は検出されなかった。

本酵素の分子量は 93,000 であり, 分子量 48,000 の同一サブユニット 2 個より構成されている。本酵素は L-セレノシステインに特異的に作用する ($K_m=0.83$ mM)。D-セレノシステイン, L-システイン, L-セリン, β -クロロ-L-アラニン, L-システインスルフィオン酸, S-メチル-L-システイン, あるいは Se-エチル-DL-セレノシステインには作用しない。ジチオスレイトールを添加しない系で反応を行うと, DL-セレノシスチン, L-シスチン, L-セレノホモシスチンあるいはセレノシスタミンはいずれも基質とはならない。L-システインは L-セレノシステインに対して基質拮抗阻害剤として作用する ($K_i=1.0$ mM)。本酵素の吸収スペクトルは 280 nm と 420 nm に吸収極大を有し, さらに 330 nm 付近に吸収の肩を示す。これらの吸収は結合補酵素, ビリドキサルリン酸に由来する。アポ酵素を用いて求めたビリドキサルリン酸に対する K_m 値は 3.3×10^{-7} M である。

各種微生物菌体の無細胞抽出液を用いて L-セレノシステイン β -リアーゼ活性の分布を検討したところ, 各種の微生物にセレノシステインからのセレン化水素生成活性が認められた⁽¹⁴⁾。一般的にその生成活性は細菌のほうが酵母やカビよりも高い傾向を示す。セレノシステインのセレノール基は良好な脱離基であることから, 基質アミノ酸の α, β -脱離反応を触媒する他のビリドキサル酵素でもセレノシステインに作用してセレン化水素, ビルビン酸とアンモニアを生成する可能性が考えられるが, 細菌ではセレノシステインからのセレン化水素とアラニンの生成量はほぼ等しい⁽¹⁴⁾。なかでも *Alcaligenes viscolactis*, *Pseudomonas alkanolytica* などの高活性菌株の比活性はブタ肝臓の抽出液中の比活性に匹敵する。

表 2 セレノシステイン β -リアーゼの性質

	ブタ肝臓酵素	<i>Citrobacter freundii</i> 酵素
分子量	93,000	63,000
サブユニット構造	二量体	単量体
等電点	5.9	6.6
吸収極大	280, 420	280, 420
ビリドキサルリン酸含量 (mol/mol)	1	1
最適 pH	8.4	7.0
基質 (K_m)	L-セレノシステイン (0.8 mM)	L-セレノシステイン (0.95 mM)
拮抗阻害剤 (K_i)	L-システイン (1.0 mM)	L-システイン (0.6 mM)

セレノシステインから生成したビルビン酸とセレノシステインの間のアミノ基転移反応によるアラニンの生成は無視しうる。一方, セレン化水素生成活性を有する酵母とカビでは細菌と比較してその活性が弱いだけでなく, いずれもアラニンの生成量はセレン化水素の約 50% 以下であった⁽¹⁴⁾。したがって, 酵母とカビにおいては L-セレノシステイン β -リアーゼ活性は非常に微弱か欠除しているものと思われる。

筆者らは *Citrobacter freundii* の L-セレノシステイン β -リアーゼを均一状態に精製し, 酵素化学的諸性質を明らかにした⁽¹⁵⁾。表 2 にブタ肝臓ならびに *C. freundii* の酵素の性質をまとめた。

2. L-セレノシステイン β -リアーゼの触媒機構

上述したように L-セレノシステイン β -リアーゼは含セレン化合物に特異的に作用する酵素の最初の例であり, システインは本酵素の基質にならず, セレノシステインと拮抗的に本酵素反応を阻害する。L-セレノシステイン β -リアーゼがシステインとセレノシステインを識別するのは, 両者の物理化学的性質の差に由来すると考えることができる。本酵素の反応機構としては次の 2 つの可能性が考えられる。すなわち, 元素状セレンがセレノシステインから酵素的に脱離し, その後反応液中に存在するセレノシステインやジチオスレイトールなどの還元剤によって非酵素的にセレン化水素に還元される可能性と, アラニンとセレン化水素がともに酵素的に生成する可能性である。後者の場合にはセレノシステインは基質であると同時に, 酵素反応に必須な還元剤として作用している。筆者らが検討した結果, セレノシステイン β -リアーゼ反応は前者の機構で進行することが明らかになった⁽¹⁶⁾。

筆者らはすでに元素状セレンがセレノシステインやジチオスレイトールなどの還元剤によって還元され、セレン化水素になることを報告している⁽¹³⁾。過剰量のジチオスレイトールが存在すれば、L-セレノシステインはL-セレノシステイン β -リアーゼの作用により化学量論的にL-アラニンとセレン化水素に分解される。しかし、この事実は必ずしもセレン化水素が1次的な酵素反応生成物であるということを意味しない。そこで筆者らは大量の酵素を含む反応系を用いて、本酵素反応の化学量論について検討した。その結果、L-セレノシステイン β -リアーゼはセレノシステインから元素状セレンを脱離し、セレン化水素の生成は未反応ジチオスレイトールによる元素状セレンの非酵素的還元に基づくことが明らかになった⁽¹⁶⁾。

筆者らが L-セレノシステイン β -リアーゼの反応を重水中で行い、アラニンへの重水素の取り込みを ^{13}C および ^1H -NMR で調べたところ、 $[\beta\text{-}^2\text{H}]$ および $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ の2種のアラニン分子種が観察された。 α -プロトンの β -プロトンに対する相対積分値は2:3であった。この結果は $[\beta\text{-}^2\text{H}_1]$ および $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -アラニンが1:1の比率で生成することを意味している。L-アラニンを重水中、単独で L-セレノシステイン β -リアーゼとともにインキュベートしても、重水素置換は観察されない。DL- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ および L- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ -セレノシステインに対する K_m および $V_{\max}$ は近似しており、D-異性体は基質 L-異性体の反応を妨害しないと考えられる。そこで、DL- $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ および DL- $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ -セレノシステインに対する $V_{\max}/K_m$ を比較したところ、3.0 という比較的大きな同位体効果が観察された。したがってセレノシステインの α 水素が酵素によって引き抜かれる段階が存在することは明らかであり、しかもそれは全酵素反応過程のなかで律速段階の1つと考えることができる。

L-セレノシステイン β -リアーゼの触媒機構を図3に示した。セレン元素が脱離したあとアラニンの β 位には必然的に重水素が1原子取り込まれるが、それ以外にもともと2原子ある β 水素のうちの1原子が0.5の確率で溶媒の重水素と交換する。重水中でアラニンを酵素とともにインキュベートしてもアラニンへの重水素の取込みは観察されないの、アラニンが活性中心から遊離する以前の段階で重水素がアラニンに取り込まれていることは明らかである。一方、セレノシステインの α 水素はアラニンの α 位に高度に保持されているので、活性中

図3 L-セレノシステイン β -リアーゼの触媒機構

心には α 水素および β 水素の授受に関与するそれぞれ別のアミノ酸残基が存在すると考えられる。

III. D-セレノシステイン α, β -リアーゼ

D型含セレンアミノ酸の細菌代謝を調べ、*Clostridium sticklandii* の細胞抽出液中に D-セレノシステインをピルビン酸、アンモニアおよびセレン元素に分解する新しい酵素を見出し、D-セレノシステイン α, β -リアーゼと命名した⁽¹⁷⁾。C. sticklandii より精製した本酵素は、分子量約74,000で、分子量35,000のサブユニット2個より構成される。ピリドキサルリン酸が補酵素であり、本酵素に強固に結合している。D-セレノシステインのほかに、D-ランチオニンなどが基質となる。D-システインに対する親和性は高いが、反応速度は小さい。一方、D-セレノシステインは全く基質にはならない。また、本酵素はD-セレノシステインと各種チオールとの β -置換反応を触媒し、対応する S-置換-D-システインを生成する。セレノールもまた置換基供与体として作用し、対応する Se-置換-D-セレノシステインを生成する。本酵素はピリドキサルリン酸酵素のなかでも D型の、しかも含セレンアミノ酸に対して高い反応性を示すという点できわめてユニークである。本酵素の触媒する置換反応を用いれば各種の D型含セレンアミノ酸を合成することができる。

以上の研究は京都大学化学研究所微生物化学部門において行われたものであり, 終始ご指導ご鞭撻賜りました京都大学教授左右田健次先生, 岡山大学教授田中英彦先生に深く御礼申し上げます。ご協力いただきました研究室内外の多くの共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

- (1) J. Onitake : *J. Osaka Med. Assoc.*, **37**, 263 (1938).
- (2) K. Ohigashi, A. Tsunetoshi and K. Ichihara : *Med. J. Osaka Univ.*, **2**, 11 (1951).
- (3) H. Tanaka, N. Esaki and K. Soda : *Biochemistry*, **16**, 100 (1977).
- (4) T. Nakayama, N. Esaki, K. Sugie, T. T. Beresov, H. Tanaka and K. Soda : *Anal. Biochem.*, **13**, 421 (1984).
- (5) N. Esaki, H. Tanaka, K. Soda and R. R. Rando : *FEBS Lett.*, **84**, 309 (1977).
- (6) N. Esaki, H. Tanaka, S. Uemura, T. Suzuki and K. Soda : *Biochemistry*, **18**, 407 (1979).
- (7) N. Esaki, T. Nakayama, S. Sawada, H. Tanaka and K. Soda : *Biochemistry*, **24**, 3857 (1985).
- (8) N. Esaki, S. Sawada, H. Tanaka and K. Soda : *Anal. Biochem.*, **119**, 281 (1982).
- (9) N. Esaki, T. Kimura, J. Goto, T. Nakayama, H. Tanaka and K. Soda : *Biochim. Biophys. Acta*, **785**, 54 (1984).
- (10) N. Esaki, H. Takada, M. Moriguchi, S. Hatanaka, H. Tanaka and K. Soda : *Biochemistry*, **28**, 2111 (1989).
- (11) T. Nakayama, N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda : *Biochemistry*, **27**, 1587 (1988).
- (12) N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka, T. Suzuki, Y. Morino and K. Soda : *Biochemistry*, **20**, 4492 (1981).
- (13) N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka and K. Soda : *J. Biol. Chem.*, **257**, 4386 (1982).
- (14) P. Chocat, N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka and K. Soda : *J. Bacteriol.*, **156**, 455 (1983).
- (15) P. Chocat, N. Esaki, K. Tanizawa, K. Nakamura, H. Tanaka and K. Soda : *J. Bacteriol.*, **16**, 669 (1985).
- (16) N. Esaki, N. Karai, T. Nakamura, H. Tanaka and K. Soda : *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 418 (1985).
- (17) N. Esaki, V. Seraneeprakarn, H. Tanaka and K. Soda : *J. Bacteriol.*, **170**, 751 (1988).