ビタミンB₁₂の生化学における最近の進歩

虎 谷 哲 夫*

Recent Advances in the Biochemistry of Vitamin B₁₂

Tetsuo TORAYA*

Recent advances in studies on the mechanism of action of vitamin B₁₂ coenzymes and on the biosynthesis of vitamin B₁₂ are reviewed. Adenosyl-B₁₂ is the first known naturally occurring organometallic compound containing a stable Co-C sigma bond. This coenzyme participates in the eleven seemingly different enzymatic rearrangement and reduction reactions, and has been well established to act as an intermediate hydrogen carrier. It is generally accepted that the early event in the reactions is the cleavage of the Co-C bond of the enzyme-bound coenzyme, which leads to generation of the catalytic center. A possible role of the apoprotein in activation of the Co-C bond of the coenzyme, which is essential for manifestation of functions of the coenzyme, is discussed on the bases of the structure-function relationship of B₁₂ coenzymes in the diol dehydrase reaction and of the apoenzyme-coenzyme interactions. The biosynthetic route for vitamin B₁₂ is also briefly summarized here with emphasis on the ring contraction step in formation of the corrin nucleus.

1. はじめに

ビタミン B₁₂ は 1948 年に Smith ら¹⁾ および Folkers ら²⁾ により肝臓中の抗悪性貧血因子として発見され、以来そのコバルトを含む独特の構造と重要な生理活性により、化学、生化学、医学、薬学など広範な分野において興味深い研究対象となってきた。1958 年には Barker らにより光に不安定な補酵素型 B₁₂ が発見され³⁾、Hodgkin 女史らによる X 線解析の結果⁴⁾、この補酵素が自然界には他に類例をみない安定なコバルト-炭素 (Co-C) シグマ結合を含んでいることが明らかになった。これを契機に B₁₂ の生化学的研究は飛躍的な発展を遂げるわけである。またこのビタミンはコリン環部分のみで 9 個もの不斉炭素を含み、構造既知の有機化合物中で最も複雑とされる構造の故に有機合成化学の最大のターゲットとなり、1972 年には Woodward と Eschenmoser の共同研究によってその全合成が達成されたことは余りにも有名である⁵⁾。

このビタミンに関して発表された論文の数はすでに膨

大なものがあり、内外の総説も数多い。従って、網羅的な紹介はたとえば筆者らの最近の総説⁶⁻¹¹⁾ およびその中の引用文献を参照されたい。本稿では最近の話題を提供するという目的で、1970 年代に顕著な進歩がみられたトピックスのうち、最も重要でかつ化学とのかかわりも深いものとして、B₁₂ 補酵素の作用機作ならびに B₁₂ の合成の 2 つに話を絞って解説することにする。他に、主として有機化学者の側から展開された B₁₂ 依存酵素の非酵素的モデル反応の研究もこの 10 年間に著しい進展の現れた分野の 1 つであるが、すでに生越¹²⁾ および筆者⁷⁾ により他で紹介されているのでここでは割愛する。

2. ビタミン B₁₂ 補酵素の作用機作

代表的なビタミン B₁₂ 類化合物 (コリノイド) の構造と名称を図 1 に示す。このうち、生体内で実際に機能する型すなわち補酵素型はアデノシル B₁₂*¹⁾ (adenosylcobalamin) とメチル B₁₂ (methylcobalamin) の 2 つである。通常は B₁₂ 補酵素といえば前者を指すが、本文中では正確を期してアデノシル B₁₂ という名称の方を用い

* 京都大学工学部工業化学教室 ()

* Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University ()

*1 B₁₂ という名称は、コリン環を含む化合物 (corrinoid) の総称として使われることもあるが、一般的には cobalamin の同義語として使用され、自然界で最も普遍的に存在する 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide を指す。

Fig. 1 Structures of vitamin B₁₂ coenzymes and related compounds.

る。表1にはアデノシル B₁₂ が補酵素として関与する酵素反応をまとめて示した。一方、メチル基移動を伴う反応（メチオニン合成、酢酸生成、メタン生成）にはメチル B₁₂ が補酵素として働く。メチル基移動の反応の方はどちらかと言えば単純な反応なのでここでは取り上げない（他の総説¹⁰⁾ 参照）。本稿では化学的にも生化学的にもより興味深いアデノシル B₁₂ 依存の生化学反応についてその反応機構と補酵素の作用機作に重点をおいて述べる。

2.1. アデノシル B₁₂ の関与する酵素反応の機構

表1にあげた水素移動を伴う反応のうち、リボヌクレオチド還元反応を除く10種の異性化、転位、脱離の各反応は、一見全く異質の反応に見えるが、実際には四角で囲んだ部分（基X）が隣接炭素上の水素と交換、転位するという共通の側面を持っている（式1）。これらの反応は、

Table 1 Enzymatic reactions in which adenosyl-B₁₂ is involved as coenzyme.

反 応	酵 素
C-C 結合の開裂を伴う反応	
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Glutamate mutase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{SCoA} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{SCoA} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	Methylmalonyl-CoA mutase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}_2 \end{array}$	α-Methylene-glutarate mutase
C-O 結合の開裂を伴う反応	
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \longrightarrow \text{RCH}_2\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} \quad (\text{R} = \text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_2\text{OH})$	Diol dehydrase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \longrightarrow \text{RCH}_2\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} \quad (\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_3, \text{H})$	Glycerol dehydrase
$\text{PPP}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Base} + \text{R}(\text{SH})_2 \longrightarrow \text{PPP}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Base} + \text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R} + \text{H}_2\text{O}$ <p>(PPP = P₃O₁₀⁴⁻)</p>	Ribonucleotide reductase
C-N 結合の開裂を伴う反応	
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \end{array} \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NH}_3$	Ethanolamine ammonia-lyase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	L-β-Lysine mutase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	D-α-Lysine mutase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Ornithine mutase
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Leucine 2,3-aminomutase

(i) 炭素骨格の組変えを伴う反応, (ii) 水またはアンモニアの脱離を伴う反応, (iii) アミノ基の分子内転位反応の3つに分類することもできる。C-X 結合の種類により、当然切断様式も異なる可能性があり、従って反応機構が異なることも予想されるが、現在までのところ機構の研究が詳細になされているのは共に (ii) の型に属するジオールデヒドラーゼとエタノールアミンアンモニアリアーゼおよび同じく C-O 結合の切断を伴うリボヌクレオチドレダクターゼの3つであり、反応機構に多様性が存在するかどうかは明らかでない。しかし、どの反応の場合もアデノシル B₁₂ が水素の中間運搬体として働いていることなど反応機構の根本的な面では共通していることが確認されている^{13,14)}。以下は主としてジオールデ

ヒドラーゼおよびエタノールアミンアンモニアラーゼを用いてなされた機構上の重要な発見の概略である。

2.1.1. 水素移動の機構 ジオールデヒドラーゼやエタノールアミンアンモニアラーゼの触媒する脱離反応は一見単純に見えるが、実際には有機化学的に考えられるのとは全く別の複雑な機構で進行する。ジオールデヒ

ドラーゼ反応の場合、Xは基質 1, 2-ジオールの 2位の水酸基であり、これが立体選択的に 1位へ移動し、生成する *gem*-ジオールからの水分子の脱離もまたエナンチオ場区別的に起こることが Rétey, Arigoni らの ¹⁸O 標識実験で示された(式2, 式3)¹⁵⁾。ただし、[1-¹⁸O] 1, 1-*gem*-ジオールの 1位の立体配置はまだ確定されていない

(R)-1,2-プロパンジオール

(S)-1,2-プロパンジオール

い。水酸基と入れ替わりに移動する水素は溶媒水素と交換しない¹⁶⁾。1位の2つの水素のどちらが動くかは2位の立体配置により決定され、(S)-1,2-プロパンジオールからは *pro-S* 水素が、(R) 体からは *pro-R* 水素が移動することが Abeles らにより示された^{17,18)}。さらに、水素の移動は2位の立体配置の反転を伴うという^{17,19)}。以上の水素移動の立体化学も合わせて式2, 3に示してある。しかし、水素の移動は、グルタミン酸ムターゼでは受入先炭素の立体配置を同じく反転させる^{20,21)}のに対し、メチルマロニル CoA ムターゼでは立体保持で進行する^{22,23)}。

[1, 1-³H₂] 1, 2-プロパンジオールと標識していない 1, 2-エタンジオールの混合物を基質として酵素反応を行うと、アセトアルデヒドにも ³H が取り込まれたという Abeles らの観察^{24,25)}から、水素移動は必ずしも分子内とは限らず、分子間でも起ることが確かめられた。また、³H 標識基質を用いるとアデノシル B₁₂ の 5' 位 (Co と直結している炭素) の立体化学的に非等価な2つの水素が両方共 ³H で置換され、逆に 5' 位の ³H はどちらも生成物のもとの隣りの炭素上へ取り込まれたという²⁵⁻²⁸⁾。同様の現象は他の酵素系でも次々と確認され、こうしてアデノシル B₁₂ が水素移動に際して、まず基質から水素を引き抜いて 5' 位に受入れ、次いで生成物のもとの隣りの位置へ返すという水素運搬体としての役割が確立された(式4)。動力学的な研究から、5' 位の2つの水素と基質から引き抜かれた1つの水素が全て等価になったような

反応中間体の存在が 2, 3 の酵素系で示唆された^{13,25,29)}。この条件を満足するものとして 5'-デオキシアデノシンが補酵素のアデノシル基から中間体として生成することが、仮定された。実際にこのものは 2, 3 の酵素系で生成することが確認され^{9,13,14,30-32)}、エタノールアミンアンモニアラーゼ系ではその生成が可逆的であることも示唆されている³²⁾。

いくつかの酵素系で測定された重水素同位体効果(k_H/k_D)はいずれも4以上で、C-H 結合の切断が律速段階であることを示している^{17,18,29)}。

2.1.2. 補酵素の Co-C 結合の開裂 水素移動の全体像はこうしてほぼ明らかになったわけであるが、では水素は H⁺, H⁻, H[•] のいずれの形で移動するのであろうか。この問題の解決にはアデノシル B₁₂ の Co-C 結合の開裂様式を調べるのが近道である。酵素反応中に補酵素の Co-C 結合が可逆的にホモリスして B₁₂ と有機ラジカルを生成する証拠は次のようなものである。図2はジオールデヒドラーゼのホモ酵素自身の電子スベ

Fig. 2 Optical spectra of the holo-diol dehydrase in the presence and absence of 1,2-propanediol^{33,34}.

Fig. 3 X-Band EPR spectrum of the holo-diol dehydrase in the presence of 1,2-propanediol³⁴.

クトル(B)は遊離のアデノシル B_{12} のそれ(A)と大差ないが、系に基質を加えると直ちに B_{12r} のようなスペクトル(C)に一変することを示している^{30,33,34}。また、図3は反応中のXバンド EPR スペクトルを示したもので、高磁場側の $g=1.95$ と 2.04 の非対称ダブルレットは有機ラジカル、低磁場側 $g=2.2\sim 2.4$ (主共鳴は $g=2.21$) の幅広い共鳴は B_{12r} の低スピン $Co(II)$ にそれぞれ由来するものと帰属されている³⁴⁻³⁸。同様の電子スペクトルおよび EPR スペクトルの変化は他の2,3の酵素系でも観察されている⁹。さらに、迅速反応速度論的解析により、ラジカル種が生成物の生成速度に十分に匹敵する速度で生成することも証明されている³⁹。以上の結果は、ジオールデヒドラーゼ反応を含む2,3の酵素反応中に補酵素の $Co-C$ 結合がホモリティックに開裂することを示しており、従って水素が水素原子($H\cdot$)の形で移動することも強く示唆している。図4は反応機構とアデノシル B_{12} の作用機作に関して、Abeles らが提出し

Fig. 4 The mechanism of action of adenosyl- B_{12} ³⁴. E, apoenzyme; $[Co]$, B_{12} moiety; $-CH_2R$, 5'-deoxy-5'-adenosyl group.

ている、現在最有力な説で¹³、概要は次のようである。まず、アポ酵素と補酵素が結合することによって補酵素の $Co-C$ 結合が活性化され、 B_{12r} とアデノシルラジカルへ解離する。基質不在下ではこの解離はごく一部であるが、基質を添加すると結合補酵素の大部分が解離型で存在するようになる。アデノシルラジカルは基質(SH)から水素原子を引き抜いて5'-デオキシアデノシンと基質ラジカルを生成する。後者は生成物ラジカルへ転位した後、5'-デオキシアデノシンより水素原子を引き抜いて生成物(PH)となり、アデノシルラジカルと B_{12r} から補酵素が再生されるというものである。

Schrauzer ら⁴⁰ および Corey ら⁴¹ は酵素反応中に $Co-C$ 結合がヘテロリシスするという仮定に立ってそれぞれ独自の機構を提案している。これらの仮説は有機金属化学の面からは興味深いものの、今の所これらを支持する実験的証拠が酵素系からは得られておらず、一般に受け入れられるには至っていない(両仮説については村上の総説⁴²)に詳しく紹介されているので参照されたい。

2.1.3. 基Xの移動の機構 基質ラジカルから生成物ラジカルへの転位、すなわち基Xの移動の機構は現在不明で今後解明すべき大きな問題の1つである。

まず、基質ラジカルが B_{12r} と再結合して新たに「基質- B_{12} 」を形成(transalkylation)した後 $\sigma-\pi$ 転位により「生成物- B_{12} 」に変わるという Dolphin らの説(図5の④)⁴³は魅力的である。しかし、 B_{12r} 中の $Co(II)$ と有機ラジカルとの距離は EPR スペクトルから $7\text{ \AA}$ と計算されており⁴⁴、共有結合が生成するとは考え難い。また、2,3-ブタジオールはジオールデヒドラーゼの⁴⁵、2-ヒドロキシプロピルアミンはエタノールアミンアンモニアアゼの⁴⁶、それぞれ基質となるが、これらからは1や2のような bulky な基質ラジカルが生成するはずであり、

Fig. 5 Possible mechanisms for group X migration¹³⁾. RCH₃, 5'-deoxyadenosine; [Co], B₁₂ moiety; SH, substrate; PH, product.

これらが B₁₂ と再結合することは困難であろう。以上のような理由から、基質ラジカルが Co と再結合した状態で転位するという説 (④) は否定的に考えられている。

それでは、基質ラジカルは Co と離れたまま生成物ラジカルへ転位するとして、果たしてラジカル種で直接転位するのか (Golding の説⁴⁷⁾, ①), それとも Co と電子の授受を行った後、カチオン (②) またはアニオン (③) の状態で転位するのであろうか¹³⁾。こういった点について、酵素系からはデータがなにも得られておらず、非酵素的モデル反応の結果から可能性が模索されているにすぎない (モデル系での研究については生越¹²⁾ および筆者⁷⁾ の総説を参照されたい)。Abeles も指摘しているように⁴⁴⁾, 転位 (基 X の移動) の過程は酵素系により異なり、多様性が存在するのかもしれない。

2.2 補酵素の構造と機能の関係 アデノシル B₁₂ という複雑な分子がその補酵素機能を発現する上で、どの部分がいかなる役割を果たしているのであろうか。この問題は換言すれば、アポ酵素によって活性点である Co-C 結合の活性化 (不安定化) を受けるために補酵素側にどのような構造が要求されるかということである。また、アポ酵素が補酵素のどの部分と相互作用するのかを探ることにもつながる。いくつかの酵素系で種々の補酵素アナログを用いて構造と機能の関係が調べられているが (筆者の総説⁴⁸⁾ 参照), 散発的なデータが多いので、ここでは最もデータの豊富なジオールデヒドラーゼにおける筆者らの研究⁴⁹⁾ を中心に述べることにする。表 2~4 において、アナログの補酵素活性はいずれもアデノシル B₁₂ のそれを 100 とする相対活性で示してある。また、酵素との親和性は K_m または K_i 値から評価できる^{*2}。

2.2.1 コリン環とその周辺側鎖 アデノシル B₁₂ の 10 位ハロゲン置換体は酵素に強く結合するにもかかわらず、補酵素活性は低い (表 2)⁵⁰⁾。この活性低下は

ハロゲン置換によるコリン環の電子構造の変化が Co-N 結合を通じて Co-C 結合の電子状態 (反応性) に影響 (シス効果) を及ぼした結果と考えられる。13-エピマーは α -プロピオンアミド側鎖が上方に延びているためにアデノシル基が本来とは異なる空間配置をとっているはずのアナログである^{57,58)}。このものは酵素に対する親和性が著しく低下しており、補酵素活性もアデノシル B₁₂ の 14% と低い⁵¹⁾。このアナログは Co 部がより親電子的になると共に⁵⁷⁾, C 環のコンホメーションも変化していることが確認されている⁵⁸⁾。

コリン環周辺の 3 つのプロピオンアミド側鎖のうち 1 つのアミド基をカルボキシル、メチルエステル、メチルアミドに変えた誘導体にはそれぞれ 3 つずつの位置異性体が存在するが、それらの補酵素活性は 7~86% と、官能基の種類と位置により大きな開きがある³⁴⁾。酵素との親和性はいずれもかなり低下しており、周辺側鎖アミド基が酵素との結合に重要であることが明らかである。 b 側鎖誘導体では $-\text{COO}^- \gg -\text{CONHCH}_3, -\text{COOCH}_3$ の順に相対活性が低下しており、この部位での酵素との相互作用には立体的因子が重要であることを示唆している。一方、 e 側鎖を修飾したものでは $-\text{CONHCH}_3 \gg -\text{COO}^-, -\text{COOCH}_3$ の順に活性が低くなっており、この部位での酵素との相互作用には水素結合が重要な役割を果たしている可能性がある。また、 e -カルボン酸、 e -メチルエステル、 b -および e -メチルアミドの各アナログと酵素との複合体は酵素反応中に失活し易く、また、Co-C 結合の活性化も不十分であるという証拠も得られている^{34,53)}。従って、補酵素のプロピオンアミド側鎖での酵素との相互作用は Co-C 結合の活性化と開裂を促進し、かつ反応中間体を安定化するのに重要な役割を果たしていると結論できよう。なお、周辺アミド側鎖が 2 つ以上加水分解されたカルボン酸アナログは全く補酵素活性を持たず⁵⁵⁾, コリン環と酵素の間の相互作用の微妙さを物語っている。

2.2.2 Co α (下方) 配位子 下方配位子のヌクレオチド部の塩基 5,6-ジメチルベンズイミダゾールを他の

*2 K_m (ミハエリス定数) は最大速度の半分の酵素反応速度を与える基質または補酵素の濃度であり、補酵素の場合、実質上は酵素からの解離定数と考えてよい。 K_i (阻害物質定数) は酵素からの阻害剤の解離定数である。

Table 2 Coenzyme activity of analogs in which the corrin ring or its side chains are modified.

Part (s) modified	Analog* ¹	Apparent K_m (μ M)	Relative activity (%)	Ref.
Corrin ring	AdoB ₁₂	0.3~0.9	(100)	(34, 50, 51)
	AdoB ₁₂ (10-Cl)	0.6	40	(50)
	AdoB ₁₂ (10-Br)	0.4	20	(50)
	AdoB ₁₂ (13-epi)	13	14	(51)
	AdoB ₁₂ (8-NH- <i>c</i> -lactam)		Inactive	(52)
	AdoB ₁₂ (8-O- <i>c</i> -lactone)		Inactive	(52)
Side chains	AdoB ₁₂ (<i>b</i> -OH)	2.3	86	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>e</i> -OH)	4.5	11	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>d</i> -OH)	8.0	66	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>b</i> -OCH ₃)	3.1	14	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>e</i> -OCH ₃)	1.9	7	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>d</i> -OCH ₃)		14	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>b</i> -NHCH ₃)	2.1	16	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>e</i> -NHCH ₃)	0.94	41	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>d</i> -NHCH ₃)	1.5	43	(34)
	AdoB ₁₂ (<i>b</i> -NHC ₂ H ₅)		Inactive	(54)
	AdoB ₁₂ (<i>e</i> -NHC ₂ H ₅)		19	(54)
	AdoB ₁₂ (OH) ₂		Inactive	(55)
	AdoB ₁₂ (OH) ₃		Inactive	(55)

*¹ Abbreviations: AdoB₁₂, adenosyl-B₁₂ or adenosylcobalamin; AdoB₁₂ (*b*-, *d*- or *e*-OH), adenosyl-B₁₂ *b*-, *d*- or *e*-carboxylic acid; AdoB₁₂ (*b*-, *d*- or *e*-OCH₃), adenosyl-B₁₂ *b*-, *d*- or *e*-methyl ester; AdoB₁₂ (*b*-, *d*- or *e*-NHCH₃), adenosyl-B₁₂ *b*-, *d*- or *e*-methanamide; AdoB₁₂ (OH)₂ (or 3), adenosyl-B₁₂ di (or tri) carboxylic acid. Recently, Anton *et al.* have proposed from the analysis of ¹³C-NMR spectra that the tentatively identified CN-B₁₂ *b*-, *e*- and *d*-carboxylic acid (in this table) should be CN-B₁₂ *d*-, *b*- and *e*-carboxylic acid, respectively⁵⁶⁾.

Table 3 Coenzyme activity in which the Co α (lower) ligand is modified.

Part (s) modified	Analog* ¹	Apparent K_m (μ M)	Relative activity (%)	Ref.
Base	AdoB ₁₂ =(Me ₂ Bza) AdoCba	0.2~0.4	(100)	(59~63)
	(Bza) AdoCba	0.2	~100	(59)
	(Ade) AdoCba	0.2	~100	(59)
	(2-SHAde) AdoCba	3.5	63	(60)
	(2-ClAde) AdoCba	0.1		(61)
	(6-MePur) AdoCba	8.9	117	(62)
Nucleotide	(aq) AdoCbi	6	Partially active	(63)
1-Amino-2-propanol	AdoB ₁₂ [-NHC(CH ₃) ₂ CH ₂ O-]	(<i>I</i> ₅₀ =1.8)* ²	Inactive	(64)

*¹ Abbreviations: Cba, cobamide; Cbi, cobinamide; Ado, adenosyl; Bza, benzimidazolyl; Ade, 7-adeninyl; Pur, purinyl; Me, methyl; aq, aqua.

*² *I*₅₀ represents a 50% -inhibition index.

ヘテロ環塩基で置き換えたアナログは酵素との結合性には差があるものの、相対活性には大差が認められない(表3)。また、ヌクレオチド部を欠くアデノシルコビンアミドも補酵素活性を一部保持していると報告されている⁶³⁾。

これらの事実から、ヌクレオチド配位子部分が直接的には触媒反応に関与しておらず、むしろアポ酵素による補酵素分子の認識部位として重要であると考えられる。

2.2.3. Co β (上方) 配位子 アデノシル B₁₂ の上方

配位子であるアデノシル基は補酵素機能に直接関係した部分であり、この配位子に対してアポ酵素側が示す特異性は Co-C 結合の活性化、すなわち補酵素機能発現の鍵を握っている^{11,48,49)}。表 4 に示すように、アデニン部分に対する特異性は極めて高く、他の核酸塩基で置き換えたアナログは全く不活性である。ネブラリルアナログ (6-デアミノ体)、N⁶-メチルおよび 3-イソアデノシルアナログが若干の補酵素活性を保持しているのに対し、ツパシジルアナログ (7-デアザ体)、1-メチル、N⁶-エチル、N⁶、N⁶-ジメチルアデノシルアナログはいずれもほとんど活性を示さない。よって、補酵素活性を持つためには基本骨格としてプリン環が最低限必要な構造であり、6位アミノ基も非常に重要であることが明白である。次項で述べるように、アポ酵素中にはアデニンに高

い特異性を示すアデノシル基結合部位が存在するので^{*3}、アデニン部の 1 位、7 位、6 位アミノ基の重要性から考えると、これらの位置での水素結合によりアデニンを認識できるような相補的構造が酵素たんぱく中に存在しているのではないかと推察される¹¹⁾。そして、この結合部位に適合し得ないような塩基を上方配位子に持つアナログは補酵素として不活性であるのみならず、酵素との結合性も顕著に低下していることが表 4 より明らかである。3-イソ体は分子模型を組んでみるとわかるように、7 位、1 位、6 位アミノ基でアデニンの 1 位、7 位、6 位アミノ基にそれぞれ対応する水素結合を形成することが可能であり、その比較的高い補酵素活性が納得できる。けい光プローブとして合成した 1, N⁶-エテノアデノシルアナログおよび 3, N⁴-エテノシチジルアナログはいずれ

Table 4 Coenzyme activity of analogs in which the Co β (upper) ligand is modified.

Part (s) modified	Analog	Apparent K_m (or K_i) (μM)	Relative activity (%)	Ref.
Adenine	Adenosyl-B ₁₂ (AdoB ₁₂)	0.8~0.9	(100)	(33, *1)
	3-Isoadenosyl-B ₁₂	1.4	36	(33)
	N ⁶ -Methyladenosyl-B ₁₂	4.2	17	(*1)
	Nebularyl-B ₁₂ (6-deamino AdoB ₁₂)	1.7	9	(33)
	Tubercidyl-B ₁₂ (7-deaza AdoB ₁₂)	1.4 (K_i)	Inactive	(*1)
	N ⁶ -Ethyladenosyl-B ₁₂	5.4 (K_i)	Inactive	(*1)
	N ⁶ , N ⁶ -Dimethyladenosyl-B ₁₂	2.4 (K_i)	Inactive	(*1)
	1-Methyladenosyl-B ₁₂	5.3 (K_i)	Inactive	(*1)
	1, N ⁶ -Ethenoadenosyl-B ₁₂	35 (K_i)	Inactive	(*1)
	Inosyl-B ₁₂	22 (K_i)	Inactive	(33)
	Guanosyl-B ₁₂	25 (K_i)	Inactive	(*1)
	Cytidyl-B ₁₂	6.1 (K_i)	Inactive	(33)
	3, N ⁴ -Ethenocytidyl-B ₁₂	1.4 (K_i)	Inactive	(*1)
	Thymidyl-B ₁₂		Inactive	(65)
	Benzimidazolerybosyl-B ₁₂	3.3 (K_i)	Inactive	(33)
Ribose	2'-Deoxyadenosyl-B ₁₂	0.3	50	(65)
	Arabinosyl-B ₁₂ (arabinose analog)	1.4	61	(33)
	Aristeromycyl-B ₁₂ (carbocyclic analog)	1.1	42	(33, 66)
	L-Adenosyl-B ₁₂	1.2 (K_i)	Inactive	(33)
	Adenosylethyl-B ₁₂	0.6 (K_i)	Inactive	(33)
	Adeninylohexyl-B ₁₂		Inactive	(33)
	Adeninylpentyl-B ₁₂	0.3 (K_i)	Inactive	(33)
	Adeninylobutyl-B ₁₂	0.5 (K_i)	Inactive	(33)
	Adeninylopropyl-B ₁₂		Inactive	(33)
	Adeninyloethyl-B ₁₂		Inactive	(33)
Adenine, ribose	Methyl-B ₁₂	0.7 (K_i)	Inactive	(33)
	CN-B ₁₂	1.9 (K_i)	Inactive	(33)
	OH-B ₁₂	0.6 (K_i)	Inactive	(*1)

*1 T. Toraya, K. Ushio, T. Matsumoto, S. Fukui, manuscript in preparation.

*3 T. Toraya, R.H. Abeles, to be published.

も不活性である。後者はシチジル B_{12} よりも高い親和性を酵素に対して示すが、これはエテノ化により構造的にアデニン環に近づいたためであろう。

リボース部分の修飾の場合も、2'-デオキシ体、アラビノースアナログ、アリストロマイシルアナログ(リボース環の酸素原子をメチレン基で置き換えたもの)のように修飾が微小なものだけに補酵素活性が一部保持されている。一方、リボースの5'炭素とCoの間にエチレン基を導入したり、D-リボースをL-リボースあるいは炭素数2~6のアルキル基で置き換えたものは全く補酵素活性を持たない。

アデニン部分とリボース部分の両方を大きく修飾したアナログ(Me B_{12} など)は言うまでもなく補酵素として不活性である。

以上のデータから、アデノシル基のアデニン部分、リボース部分の両方が補酵素機能に不可欠であることが明らかである。種々のアナログのCo-C結合のホモリシス(光分解)やヘテロリシス(シアン分解、酸分解)

における固有の化学反応性と補酵素活性の間には直接の相関関係は認められない³³⁾。そこで上方配位子の構造とCo-C結合の活性化(補酵素活性)および酵素との結合性(K_m または K_i 値)の関係をみると、上方配位子修飾アナログは大きく4つのカテゴリーに分類できる(図6)⁴⁹⁾。タイプ1の B_{12} 類は補酵素活性を有し、酵素に対する親和性も高い一群のものであり、構造的には共通してアデニン部分またはリボース部分に微小な修飾を受けただけのものである。図6のAに示したように、これらはアデニン部とリボース部の両方で酵素と相互作用することによりCo-C結合が活性化されて、触媒反応に関与し得る。タイプ2の B_{12} 類はアデニン部分が大きく修飾を受けたもの、あるいは他の塩基で置換されたアナログである。これらは塩基部分での酵素との相互作用が不適切なためCo-C結合が充分活性化されず、補酵素として働かない(B)。タイプ3の B_{12} 類はD-リボース部分がL-リボースや他の基によって置換されたもので、やはり補酵素活性を持たない(C)。これらは B_{12} 部分以外にアデニン部分でも酵素と結合し得るので、酵素に対する親和性が非常に高いという特徴がある。タイプ4の B_{12} 類はアデニン部分、リボース部分とも大きく修飾されたアナログであり、当然酵素によるCo-C結合の活性化を受けられず、不活性である(D)。このタイプのアナログも酵素に対する親和性はかなり高く、従って、アナログの酵素への結合性とCo-C結合活性化が必ずしも対応していないのは明白である。

2.3. Co-C結合の活性化とアポ酵素の役割 酵素反応においてアデノシル B_{12} のCo-C結合が可逆的に開裂、再生を繰り返すことによって補酵素作用が営まれることはすでに述べてきたが、遊離補酵素ではこのような反応は決して起こらない。このCo-C結合は通常条件下では光を当てない限り安定であり、開裂にはタンパク部分(アポ酵素)による“活性化”を必要とする。ではアポ酵素はいかにしてCo-C結合を不安定化して、補酵素を活性化するのであろうか。これまでアポ酵素の果たす役割についてはずっと無視され続けてきた感があるが、最近いくつかの重要な知見が得られているので、この根本的な問題に関する研究の現状を紹介する。

2.3.1. アポ酵素中のアデノシル基結合部位 補酵素の構造と機能の関係の研究結果はアポ酵素側の補酵素結合部位に関する情報でもあり、特に、上方配位子に対する高い特異性は酵素中にアデノシル基結合部位が存在することを予想させるものである。筆者らはアデノシル B_{12} のフラグメントとしての5'-デオキシアデノシンおよび B_{12} 類とジオールデヒドラーゼの相互作用を研究し、ア

Fig. 6 Possible interactions between diol dehydrase and adenosyl- B_{12} or its analogs in relation to the activation of the Co-C bond⁴⁹⁾. (Co), B_{12} moiety.

Fig. 7 Binding of 5'-deoxyadenosine and B_{12r}*³).

デノシル基結合部位の存在を実証した^{*3}。図7に示すように、アポ酵素中のこの部位と5'-デオキシアデノシンの結合は可逆的であるが ($K_D \sim 10^{-5}$ M), 系に B_{12r} または OH-B₁₂ を加えると不可逆となり、3者間に 1:1:1 の複合体が形成される。この場合、メチル基以上のかさ高な上方配位子を持つ B₁₂ 類を加えても 5'-デオキシアデノシンはこれらと共に酵素に結合することはできず、解離してしまう。このことはこの部位が空間的に極めて狭いことを意味している。添加の順序を逆にして、先に酵素-B₁₂ 複合体を形成させてしまうと、もはや 5'-デオキシアデノシンを加えても結合できないことから、このヌクレオシドは B₁₂ によって閉じ込められるような形で酵素に結合するのであろう。アデノシル基結合部位に対する親和性は 5'-デオキシアデノシン $\approx$ 5'-デオキシ-*ara*-アデノシン > 4',5'-アンヒドロアデノシン > アデノシン > アデニン > 5',8-サイクリックアデノシンの順に低下し、5'-デオキシウリジンは全く結合性を示さない。従って、この部位はアデニンヌクレオシドに高い特異性を示す上方配位子 (アデノシル基) 結合部位として、補酵素機能発現 (Co-C 結合活性化) に重要な役割を果たしていると考えられる。また、上方配位子修飾アナログの補酵素活性は、それぞれの上方位子部分がこの部位と適切に相互作用し得るかどうかというテンプレート効果によって決定されるのであろう。

2.3.2. Co-C 結合の活性化 アデノシル B₁₂ の Co-C 結合がホモリシスする際の解離エネルギーは Halpern によると 20~30 kcal/mol と見積もられている⁶⁷⁾。しかし酵素に結合した状態ではこの値はもっと小さくなっているであろう。B₁₂ 類の配位子間には相互に電子的

効果を及ぼし合う、いわゆるシス効果、トランス効果が認められている。特に上方配位子がコリン環の電子構造に及ぼすシス効果は電子スペクトル的にコリン環の π - π^* 遷移に基づく吸収から詳細に調べられている。同じくシス効果で逆にコリン環の電子構造の変化が axial 配位子の電子構造 (反応性) に変化を与えることも 2,3 の例から明らかである。式5の反応はコリン環の 10-ハ

ロゲン置換体のスルフィト型では起こるが、通常のスルフィト B₁₂ では起こらず⁶⁸⁾、10位のハロゲンが電子吸引力により B_{12s} を安定化することを示唆している。また、酵素系でも補酵素の 10-ハロ体を用いた場合、Co-C 結合の活性化がやや不十分で活性が低いことが示されている⁵⁰⁾。ではアデノシル B₁₂ がアポ酵素に結合することによりコリン環の電子構造が変化するであろうか。いくつかの B₁₂ 類では酵素に結合するとその電子スペクトルに若干のシフトが観察されており^{*4}、これはコリン環のひずみによる電子構造の変化を反映しているのかもしれない。コリン環の周辺アミド側鎖の修飾が補酵素活性に重大な影響を及ぼすという事実³⁴⁾ は、酵素と周辺アミド基の相互作用がこのひずみを起こす上で重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

Co-C 結合の活性化を考える上で、もう一つの重要な因子は上方配位子のアデノシル基の寄与である。アポ酵素中のアデノシル基結合部位と 5'-デオキシアデノシンの結合による自由エネルギー変化 (ΔG) は約 -7 kcal/mol である¹¹⁾。このアデノシル基を引き付ける効果とコリン環をひずませようとする効果が協奏的に作用することによって、アポ酵素は補酵素の Co-C 結合を活性化すると推察される。最近、筆者らはアデニルエチル B₁₂ がほとんど補酵素活性を示さないにもかかわらず、ジオールデヒドラーゼのアポ酵素と結合することによって式6のように分解することを見出した^{*5}。この Co-C 結

合の開裂はアデニン環と Co の間の連結基が 3 以上の同族アナログでは認められない。おそらく、連結鎖が長く

*3 T. Toraya, R. H. Abeles, to be published.

*4 T. Toraya, N. Watanabe, S. Fukui, to be published.

*5 T. Toraya, N. Watanabe, K. Ushio, S. Fukui, to be published.

なるとそのフレキシビリティのためにアデニン部に働く引き付け効果が解消されて Co-C 結合の活性化につながらないのであろう。

Schrauzer らはごく最近、立体障害のある上方配位子を持つ有機 B₁₂ 類の Co-C 結合が非酵素的に容易に開裂することを報告し、これは下方配位子の塩基の配位によりコリン環が上方へひずむためであると説明している⁶⁹⁾。この考え方は、筆者の推定しているアポ酵素による Co-C 結合活性化の機構と相通じるところがあり、興味深い。

3. ビタミン B₁₂ の生合成

B₁₂ の生合成は同じくテトラピロール化合物であるポルフィリンとの関係から非常に興味が持たれてきたにもかかわらず、その複雑さの故に解明が遅れていた。特に、肝心のポルホビリノーゲン (PBG) からコリンに至る経路はポルフィリン生合成との分岐点すら長い間あいまいなままであった。1970 年代に入って、非破壊的に標識パターンが調べられる有力な手段としての ¹³C-フーリエ変換 NMR (FT-NMR) の普及、そして無細胞系での酵素反応の成功など方法論の進歩により著しく研究が加速されて、次々と新知見が付け加えられ、蓄積しつつある。

代表的な B₁₂ 生産菌の 1 つである *Propionibacterium shermanii* を主に用いて得られた成果を以下に簡単にまとめてみる。なお、B₁₂ の生合成については最近の上久保⁸⁾ および梶原⁷⁰⁾ の総説に詳しく解説されているが、ここではそれ以後の進歩に重点を置いて紹介する。

3.1. コリン環のメチル基の起源 コリン環の 8 個のメチル基のうち、12 位の 1 つのメチル基は δ-アミノレプリン酸 (ALA) 3 の C-2 から、残り 7 個はメチオニンのメチル基から生成することが、Scott らおよび Battersby らによって、[2-¹³C] ALA, [5-¹³C] ALA, [¹³CH₃] L-メチオニンをを用いた取り込み実験で示された (図 8)⁷¹⁻⁷⁶⁾。コリン環 1 位のメチル基は ALA の C-5 に由来するとしていた Shemin らの報告⁷⁷⁾ が覆されたのである。さらに、コリン環 12 位の 2 つのメチル基のうち、α のメチル基 (*pro-R*) はメチオニンに、β のメチル基 (*pro-S*) は ALA にそれぞれ由来することも証明された。

3.2. PBG および Uro'gen III の B₁₂ 分子への取り込み ALA が 2 分子縮合してできる PBG 4 はポルフィリン等のテトラピロール化合物の前駆体であり、当然 B₁₂ の前駆体でもあることが Schwartz らにより [¹⁴C] PBG を用いて示されていたが⁷⁸⁾ 分解反応による確認は

Fig. 8 Biosynthesis of vitamin B₁₂.

なされていなかった。Scott らは [8-¹⁴C] PBG あるいは [8-¹³C] PBG の添加実験により、その特異的取り込みを証明した^{72, 79-81)}。

PBG 以後の経路では、ポリフィリン生合成との関連からウロポルフィリノーゲン III (Uro'gen III と略す) 6 が両者の分岐点ではないかと仮説的に考えられていたにすぎなかった。Scott らおよび Battersby らのグループは ¹³C あるいは ¹⁴C 標識 Uro'gen III がコリン環へ変換されることを増殖菌体あるいは無細胞抽出液を用いて実証した^{72, 76, 79-85)}。Uro'gen III は B₁₂ の前駆体ではないという西独グループの報告^{86, 87)} もあるが、これは反応が嫌気条件を要することに気付かなかったためとされている⁸⁾。

3.3. Uro'gen III からコリン環への経路 その後、Uro'gen III から最も初期のコリノイドであるコピリン酸 9 に至る経路の中間体の探索が Bykhovsky ら^{88, 89)} および Müller ら⁹⁰⁾ によって行われ、彼らによって *P. shermanii* 中に発見されたイソバクテリオクロリン体あるいは factor II が sulfite reductase から単離されたシロヒドロクロリン 10^{91, 92)} と同一であることが確認された⁹³⁾。さらに、同じく *P. shermanii* から分離された factor III^{94, 95)} が Battersby ら⁹⁶⁾ および Scott ら⁹⁷⁾ によってトリメチルイソバクテリオクロリン体 (20-メチルシロヒドロクロリン) 11 であることも確認された。

さて、いよいよ B₁₂ 生合成の中で化学的にみて最も興味深い段階である、コリンへの環縮小の過程であるが、これに関して極く最近重要な論文が発表された。まず、Arigoni らはコリン環の 1 位メチル基は 20-メチルシロヒドロクロリン 11 の 20 位メチル基に由来するものではなく、別個にメチオニンから取り込まれることを報告した⁹⁸⁾。さらに、Arigoni ら⁹⁹⁾ および Battersby ら¹⁰⁰⁾ は、特異的に ¹⁴C で標識した 20-メチルシロヒドロクロリンを前駆体として *P. shermanii* の粗抽出液を作用させると、C-20 および 20 位メチル基の酢酸としての脱離を伴ってコリンへと環縮小が起こることを証明した。従来は、C-20 メチル炭素がホルムアルデヒドとして脱離することにより A 環と D 環が直結し、コリン環が生成するとされていたのであるが (Scott らの説)¹⁰¹⁾、ホルムアルデヒドは前駆体が不安定で分解し易いために生成するのであることが示されて、この説は覆されたわけである。

酢酸生成に伴う環縮小反応が有機化学的にも起こり得ることは Eschemoser らによって示された (図 9)¹⁰²⁾。すなわち、モデル系で、20-ヒドロキシ-1, 20-ジメチル体の Ni 錯体 12 あるいは Co 錯体 13 が融解により 19-アセチル-1-メチル体 (14 および 15) に転位し、この

Fig. 9 Chemical models for the ring contraction step in vitamin B₁₂ biosynthesis¹⁰²⁾.

うち Ni 錯体 14 の方は 2 MKOH で処理することにより脱アセチル化されてコリン環 16 を生成することが確認されたのである。この反応は、1 位メチル基からエksomethilenを生ずることなくコリン環が生成するという Scott らの実験結果⁷⁰⁾ ともよく合致し、コリン環への環縮小反応のモデルとして極めて有望かつ示唆的である。

3.4. 生合成上の残された問題 B₁₂ 生合成の研究はこうしていよいよ大詰めに来た感がある。まだ残されている問題で重要なものはやはり Uro'gen III 6 からコピリン酸 9 への経路に集中しており、たとえば、環の酸化-還元、Co の導入、7 つのメチル基の導入、コリン環 12 位の酢酸基の脱炭酸などがあげられる。

コピリン酸から B₁₂ に至る経路についてはすでに大筋が明らかになっている (上久保の総説¹⁰³⁾ 参照)。すなわち、6 つの周辺カルボキシル側鎖 (a~e, g) のアミド化とイソプロパノールアミン (L-スレオニンより生成) の f 側鎖への結合、下方配位子のヌクレオチド部分の導入が起こって B₁₂ 分子が完成するわけである。補酵素型のアデノシル基は ATP に由来するが、その導入はコピリン酸 9 以降の非常に早い時期に起こるとされている。また、塩基 5, 6-ジメチルベンズイミダゾールは通常フラビンからつくられる¹⁰⁴⁾。

もう一つ興味深いのは、Toohey らが *Chromatium* その他の光合成菌から^{105, 106)}、福井らが *Streptomyces olivaceus* から¹⁰⁷⁾、上久保ら¹⁰⁸⁾ および Kopenhagen ら¹⁰⁹⁾ が *Rhodopseudomonas spheroides* からそれぞれ単離した Co を含まないコリノイドが果たして B₁₂ 生合成の中間体であるかどうかという問題である。最近、Kopenhagen らは Co 欠如コリノイド hydrogenobyrrinic acid-a, c-diamide や hydrogenobyrric acid が *P. shermanii* や *R. spheroides* の菌体破砕液によっても

Co コリノイドに変換されず、従って B₁₂ の前駆体ではないと報告している¹⁰⁹⁾。しかし、Co 欠乏培地で蓄積する 18,19-ジデヒドロ体が Co 挿入直前の前駆体である可能性は残っている¹⁰⁹⁾。

いずれにせよ、現在の研究進展速度から考えると、B₁₂ 生合成の完全解明の日もそう遠くないように思われる。

4. おわりに

ビタミン B₁₂ の発見以来 30 余年、補酵素型の発見からでも 20 数年になる。B₁₂ 生合成の研究は 1970 年代初めから現在に至るまで著しい発展を遂げつつある分野である。一方、B₁₂ 補酵素の作用機作の研究の方は 1960 年代から 1970 年代の初めにかけて重要な発見がなされたものの、ここ 10 年間の進歩はその前の 10 数年間に比べて明らかに速度が鈍っている。このビタミンのように複雑でしかも Co 錯体という独特の構造を持つ化合物はもとと生化学者だけの手には余るという宿命を背負っており、生化学者との分野の研究者間の学際的協力が必要である。事実、本稿で取り上げた 2 つの中心的研究課題において、有機化学的、錯体化学的着想と方法論がこれまでの進歩に重要な役割を果たしてきたことは、読者諸氏がすでにお気付きの通りである。幸い、最近は何々の学際的研究が盛んになってきており、有機化学者、錯体化学者の側からもこのビタミンに対する活発なアプローチがなされていることは心強い。なお一層の発展と生化学へのフィードバックを願うものである。

(昭和 56 年 8 月 21 日受理)

文 献

- 1) E. L. Smith, L. F. G. Parker, *Biochem. J.*, **43**, viii (1948)
- 2) E. L. Ricks, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood, K. Folkers, *Science*, **107**, 396 (1948)
- 3) H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1093 (1958)
- 4) P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature*, **192**, 937 (1961)
- 5) R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.*, **33**, 145 (1973)
- 6) 福井三郎, ビタミン学 (日本ビタミン学会編), II 巻, p. 477 (1980), 東京化学同人
- 7) 虎谷哲夫, *ibid.*, II 巻, p. 484 (1980), 東京化学同人
- 8) 上久保正, *ibid.*, II 巻, p. 502 (1980), 東京化学同人
- 9) 虎谷哲夫, *ibid.*, II 巻, p. 508 (1980), 東京化学同人
- 10) 清水祥一, 佐藤一精, *ibid.*, II 巻, p. 523 (1980), 東京化学同人
- 11) 虎谷哲夫, 生化学, **53**, 401 (1981)
- 12) 生越久靖, 化学, **32**, 112 (1977)
- 13) R. H. Abeles, D. Dolphin, *Acc. Chem. Res.*, **9**, 114 (1976)
- 14) B. M. Babior, *ibid.*, **8**, 376 (1975)
- 15) J. Rétey, A. Umani-Rouchi, J. Seibl, D. Arigoni, *Experientia*, **22**, 502 (1966)
- 16) A. M. Brownstein, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1199 (1961)
- 17) B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos, R. H. Abeles, *ibid.*, **241**, 3028 (1966)
- 18) P. A. Frey, G. L. Karabatsos, R. H. Abeles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 551 (1965)
- 19) J. Rétey, A. Umani-Rouchi, D. Arigoni, *Experientia*, **22**, 72 (1966)
- 20) M. Sprecher, R. L. Switzer, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.*, **241**, 864 (1966)
- 21) M. Sprecher, D. B. Sprinson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 655 (1964)
- 22) M. Sprecher, M. J. Clark, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.*, **241**, 872 (1966)
- 23) M. Sprecher, M. J. Clark, D. B. Sprinson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 581 (1964)
- 24) R. H. Abeles, B. Zagalak, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1245 (1966)
- 25) P. A. Frey, M. K. Essenberg, R. H. Abeles, *ibid.*, **242**, 5369 (1967)
- 26) P. A. Frey, R. H. Abeles, *ibid.*, **241**, 2732 (1966)
- 27) P. A. Frey, S. S. Kerwar, R. H. Abeles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 873 (1967)
- 28) P. A. Frey, M. K. Essenberg, R. H. Abeles, S. S. Kerwar, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4488 (1970)
- 29) M. K. Essenberg, P. A. Frey, R. H. Abeles, *ibid.*, **93**, 1242 (1971)
- 30) O. W. Wagner, H. A. Lee, Jr., P. A. Frey, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1751 (1966)
- 31) R. Yamada, Y. Tamao, R. L. Blakley, *Biochemistry*, **10**, 3959 (1971)
- 32) B. M. Babior, T. J. Carty, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.*, **249**, 1689 (1974)
- 33) T. Toraya, K. Ushio, S. Fukui, H. P. C. Hogenkamp, *ibid.*, **252**, 963 (1977)
- 34) T. Toraya, E. Krodell, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, *Biochemistry*, **18**, 417 (1979)
- 35) T. H. Finlay, J. Valinsky, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1285 (1973)
- 36) J. E. Valinsky, R. H. Abeles, A. S. Mildvan, *ibid.*, **249**, 2751 (1974)
- 37) S. A. Cockle, H. A. O. Hill, R. J. P. Williams,

- S. P. Davies, M. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 275 (1972)
- 38) K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sands, J. A. Fee, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 510 (1975)
- 39) J. E. Valinsky, R. H. Abeles, J. A. Fee, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4709 (1974)
- 40) G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, *ibid.*, **92**, 1022 (1970)
- 41) E. J. Corey, N. J. Cooper, M. L. H. Green, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 811 (1977)
- 42) 村上幸人, 錯体化学からみた生体系とそのモデル (日本化学会編), p. 83 (1978), 学会出版センター
- 43) R. B. Silverman, D. Dolphin, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4626, 4633 (1976)
- 44) R. H. Abeles, "Vitamin B₁₂" (B. Zagalak, W. Friedrich, eds.), p. 373 (1979) Walter de Gruyter
- 45) T. Toraya, T. Shirakashi, T. Kosuga, S. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 475 (1976)
- 46) S. W. Graves, J. S. Krouwer, B. M. Babior, *J. Biol. Chem.*, **255**, 7444 (1980)
- 47) B. T. Golding, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 6331 (1976)
- 48) 虎谷哲夫, ビタミン, **51**, 87 (1977)
- 49) T. Toraya, S. Fukui, *Adv. Chem. Ser.*, **191**, 139 (1980)
- 50) Y. Tamao, Y. Morikawa, S. Shimizu, S. Fukui, *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 260 (1968)
- 51) T. Toraya, T. Shirakashi, S. Fukui, H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry*, **14**, 3949 (1975)
- 52) P. Rapp, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 887 (1972)
- 53) T. Toraya, R. H. Abeles, *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 174 (1980)
- 54) P. Rapp, R. Hildebrand, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1141 (1972)
- 55) 玉尾嘉邦, 森川 康, 清水祥一, 福井三郎, ビタミン, **41**, 45 (1970)
- 56) D. L. Anton, H. P. C. Hogenkamp, T. E. Walker, N. A. Matwiyoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2215 (1980)
- 57) R. D. Tkachuck, M. E. Grant, H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry*, **13**, 2645 (1974)
- 58) H. Stoeckli-Evans, E. Edmond, D. C. Hodgkin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1972**, 605
- 59) R. H. Abeles, H. A. Lee, Jr., *J. Biol. Chem.*, **236**, 2347 (1961)
- 60) M. Hayashi, T. Kamikubo, *FEBS Lett.*, **15**, 213 (1971)
- 61) T. Kamikubo, H. Narahara, K. Murai, N. Kumamoto, *Biochem. Z.*, **346**, 159 (1966)
- 62) 内田幸男, 林 光則, 上久保 正, ビタミン, **47**, 27 (1973)
- 63) T. Kato, S. Shimizu, S. Fukui, *J. Vitaminol. (Kyoto)*, **10**, 89 (1964)
- 64) W. Friedrich, H. C. Heinrich, E. König, P. Schulze, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 601 (1964)
- 65) H. P. C. Hogenkamp, T. G. Oikawa, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1911 (1964)
- 66) S. S. Kerwar, T. A. Smith, R. H. Abeles, *ibid.*, **245**, 1169 (1970)
- 67) J. Halpern, *Adv. Chem. Ser.*, **191**, 165 (1980)
- 68) F. Wagner, *Proc. Roy. Soc. (London) A*, **288**, 344 (1965)
- 69) G. N. Schrauzer, J. H. Grate, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 541 (1981)
- 70) 梶原正宏, 化学, **35**, 198 (1980)
- 71) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, P. J. Whitman, R. J. Cushley, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8267 (1972)
- 72) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, R. J. Cushley, P. J. Whitman, *ibid.*, **96**, 8069 (1974)
- 73) A. Battersby, M. Ihara, E. MacDonald, J. R. Stephenson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 404
- 74) A. Battersby, M. Ihara, E. MacDonald, J. R. Stephenson, *ibid.*, **1974**, 458
- 75) A. Battersby, R. Hollenstein, E. MacDonald, D. C. Williams, *ibid.*, **1976**, 543
- 76) A. R. Battersby, M. Ihara, E. MacDonald, J. R. Redfern, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1977**, 158
- 77) R. C. Bray, D. Shemin, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1501 (1963)
- 78) S. Schwartz, K. Ikeda, I. M. Miller, C. J. Watson, *Science*, **129**, 40 (1959)
- 79) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, R. J. Cushley, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8269 (1972)
- 80) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **35**, 72 (1973)
- 81) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 8054 (1974)
- 82) A. I. Scott, B. Yagen, E. Lee, *ibid.*, **95**, 5761 (1973)
- 83) A. I. Scott, N. Georgopapadakou, K. S. Ho, S. Klioze, E. Lee, S. L. Lee, G. H. Temme, III, C. A. Townsend, *ibid.*, **97**, 2548 (1975)
- 84) A. R. Battersby, M. Ihara, E. MacDonald, F. Satoh, D. C. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1975**, 436
- 85) H. C. Dauner, G. Müller, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1353 (1975)

- 86) G. Müller, W. Dieterle, *ibid.*, **352**, 143 (1971)
 87) B. Franck, D. Gantz, F. Huper, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **11**, 420 (1972)
 88) V. Y. Bykhovsky, N. Y. Zaitseva, N. V. Bukin, *Dokl. Acad. Sci. USSR*, **224**, 1431 (1975)
 89) V. Y. Bykhovsky, N. I. Zaitseva, A. V. Umrikhina, A. N. Yavorskaya, *Priklad. Biokhim. Mikrobiol.*, **12**, 825 (1976)
 90) R. Deeg, H. P. Kriemler, K. H. Bergmann, G. Müller, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 339 (1977)
 91) L. M. Siegel, M. J. Murphy, H. Kamin, *J. Biol. Chem.*, **248**, 251 (1973)
 92) A. I. Scott, A. J. Irwin, L. M. Siegel, J. N. Shoolery, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 316 (1978)
 93) A. R. Battersby, E. MacDonald, M. Thompson, V. Y. Bykhovsky, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, 150
 94) K. H. Bergmann, R. Deeg, K. D. Gneuss, H. P. Kremler, G. Müller, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1315 (1977)
 95) A. R. Battersby, E. MacDonald, *Bioinorg. Chem.*, **7**, 161 (1978)
 96) A. R. Battersby, G. W. J. Matcham, E. MacDonald, R. Neier, M. Thompson, W. D. Woggon, V. Y. Bykhovsky, H. R. Morris, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 185.
 97) G. Müller, K. D. Gneuss, H. P. Kriemler, A. I. Scott, A. J. Irwin, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3655 (1979)
 98) C. Nussbaumer, M. Imfeld, G. Wörner, G. Müller, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **78**, 9 (1981)
 99) L. Mombelli, C. Nussbaumer, H. Weber, G. Müller, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **78**, 11 (1981)
 100) A. R. Battersby, M. Bushell, C. Jones, N. G. Lewis, A. Pfenninger, *ibid.*, **78**, 13 (1981)
 101) M. Kajiwarra, K. S. Ho, H. Klein, A. I. Scott, A. Gossauer, J. Engel, E. Neumann, H. Zilch, *Bioorg. Chem.*, **6**, 397 (1977)
 102) V. Rasetti, A. Pfaltz, C. Kratky, A. Eschenmoser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **78**, 16 (1981)
 103) 上久保 正, 新ビタミン学(日本ビタミン学会編), p. 368 (1969)
 104) J. A. Horig, P. Renz, *Eur. J. Biochem.*, **105**, 587 (1980)
 105) J. I. Toohey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 934 (1965)
 106) J. I. Toohey, *Fed. Proc.*, **25**, 1628 (1966)
 107) K. Sato, S. Shimizu, S. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 170 (1970)
 108) T. Kamikubo, K. Sasaki, M. Hayashi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **23**, 179 (1977)
 109) B. Dresow, G. Schlingmann, L. Ernst, V. B. Kopenhagen, *J. Biol. Chem.*, **255**, 7637 (1980)

お 知 ら せ

1979年1月より報文, ノートの Synopsis 化を実施致しております。これに伴う料金は下記の通りです。

掲載された抄報の原報(マイクロフィッシュ)およびそのコピーを希望される方は規定の代金を添えて(現金書留, または郵券)お申し込み下さい。

記

- ◎ 投稿料 **10,000 円**
 (抄報の別刷 50 部, 原報のマイクロフィッシュとそのコピー (B5 判) 各 1 部を含む)

- ◎ 原報のマイクロフィッシュ **1 部 500 円**
 ◎ 原報のコピー (B5 判) **1 ページ* 50 円**
 [前金, 郵送料込み]
 (*原報のページ数は抄報に記載されています。
 国外宛航空便は別途取り扱います。)

なお、「投稿規定」、「原稿執筆の手引」は本年1月号に、抄報の“ひな型”は昨年(第38巻)にも数報掲載されておりますので、ご投稿の際はこれらをご参照下さい。