

# 銅含有アミン酸化酵素のトパキノン補酵素生成過程の研究

関西学院大学理工学部 山口宏

## Structural Studies of Topaquinone Biogenesis of Copper Containing Amine Oxidase

Hiroshi Yamaguchi  
School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

### 要旨

Copper-containing amine oxidase catalyzes the oxidative deamination of various biogenic primary amines. The enzyme contains a covalently bound organic cofactor, 2,4,5-trihydroxyphenylalanine (topa) quinone, which is formed by post-translational modification of a specific tyrosine residue in the presence of cupric ion and molecular oxygen (called biogenesis). The structures of phenylethylamine oxidase from *Arthrobacter globiformis* have been determined for both the inactive apo-form and the active holo-form. In addition, in order to elucidate the mechanism of the topa quinone biogenesis, we analyzed intermediate structures during the biogenesis reaction. Apo enzyme crystals were anaerobically soaked in copper solution and freeze-trapped for determination of the initial structure of the topa quinone biogenesis. To see the structure in the following stage, we started the reaction by exposing the copper-bound crystals to the air, and freeze-trapped them immediately and sufficiently long after the exposure. The structures of three distinct intermediates were determined at atomic resolution. The molecular mechanism of the topa quinone biogenesis will be discussed on the basis of these X-ray snapshots.

### はじめに

近年、アミノ酸が翻訳後修飾を受けて生じた誘導体がタンパク質中で補酵素として働いている例が見つかっている。これらの補酵素は他のアミノ酸残基と区別なく遺伝子中で通常のアミノ酸としてコードされている。タンパク質翻訳過程では、通常のアミノ酸として作られた後、これらのアミノ酸残基の翻訳後修飾によって補酵素に誘導されるため、これらをビルトイン補酵素と呼ぶ。今までに見つかっている

ビルトイン補酵素には、銅イオンを補欠金属として含むアミン酸化酵素中の 2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン(トパキノン、TPQ、図 1)<sup>(1)</sup> やリシルチロシルキノン<sup>(2)</sup>、アミン脱水素酵素中のトリプトファントリプトファンルキノン<sup>(3)</sup> やシステイントリプトファンルキノン<sup>(4,5)</sup> がある。これらの補酵素はキノン体であり、キノノイド補酵素と呼ぶ。また、キノノイド補酵素を活性部位に持つタンパク質群をキノプロテインと呼ぶ。我々は、ビルトインキノノイド補酵素のうちトパキノンを取り上げ、いかにして翻訳後修飾反応が進行するのかを明らかにするために銅含有アミン酸化酵素の構造研究を行ってきた。

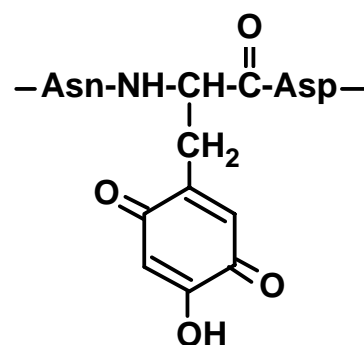


図1 トパキノンの化学構造

## 銅含有アミン酸化酵素

銅含有アミン酸化酵素は、動物、植物、バクテリアなど種々の生物種にわたって存在しており、その生物種により生物学的役割は異なっていると考えられている。我々が用いた土壌菌では、アミン類を窒素源として用いるためにアミン酸化酵素が用いられていると考えられている。銅含有アミン酸化酵素は、一級アミンの酸化的脱アミノ反応を触媒し、分子量7万から8万のホモダイマーである。現在一次構造が明らかになっているアミン酸化酵素間のアミノ酸配列のホモロジーはあまり高くないが、トパキノンに変換されるチロシン残基前後のアミノ酸残基は保存されており、N-Y-(D/E)がトパキノン生成のためのコンセンサス配列であると考えられている。

我々は、グラム陽性土壌菌である *Arthrobacter globiformis* 由来のフェニルエチルアミン酸化酵素(AGAO)を用いてトパキノン生成機構解明のための構造研究を行った。本酵素は他の銅含有アミン酸化酵素と同様同一サブユニットからなる二量体構造をとり、各サブユニットは638アミノ酸残基からなる。本酵素の場合、Tyr382が翻訳後修飾を受けトパキノンに変換され、その前後には、トパキノン生成のためのコンセンサス配列が存在する。このチロシンからトパキノンへの変換は、他の触媒酵素を必要とせず、タンパク質が折れたたまった後に銅イオンと酸素の存在下で自動的に進行することが谷澤らによって示された。即ち、厳密に銅イオンを除去した条件下で、菌体培養、タンパク質精製を行ったところトパキノンを含まない前駆体アポ型タンパク質として精製され、このアポ型タンパク質に銅イオンを加え好気条件に保つとトパキノンが生成した<sup>(6)</sup>。このトパキノン自動生成過程のことをバイオジェネシスとよぶ。トパキノンを含まないアポ型酵素は無色であるが、生成したトパキノンは480nm付近を極大とする吸収を示すため、活性ホロ型酵素はピンクから赤みがかかった色を示す。

X線による構造研究が開始されるまでに、トパキノン生成における銅イオンの役割やチロシン環に付加される酸素原子の由来などを解明するために、同位体酸素を

用いた実験や ESR、CD、共鳴ラマンなどの分光学的手法を用いて解析が行われていた<sup>(7,8,9)</sup>。これらの結果から、2 価の銅イオンがアポ型酵素と結合して還元され、この 1 価銅イオンが分子状酸素や前駆体チロシン残基の活性化に用いられるという機構が推定されていた。また、トパキノンの C2 位の酸素は溶媒の水分子に由来する事が明らかにされていた。

### 前駆体アポ型と活性ホロ型の結晶構造解析

トパキノンの生成過程において、タンパク質構造がどのように変化していくのを知ることは極めて重要である。構造研究を開始した後、我々の構造が明らかになるのに先んじて、大腸菌由来酵素とエンドウ豆の芽生え由来のアミン酸化酵素の結晶構造が明らかにされた<sup>(10,11)</sup>。しかしながら、それらの構造は活性ホロ型の構造であり、ホロ型構造のみでは、トパキノン生成に関しての知見はそれほど多いとはいえなかった。このため、我々は構造解析を続行し、前駆体アポ型酵素と、活性ホロ型酵素の結晶を得ることに成功した。アポ型は回転対陰極型発生機とイメージングプレート回折計を用いて、ホロ型は PF の巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いて、室温において 2.2 分解能までの回折強度データを収集することができた。両型の結晶は同形であり、空間群  $C2$  に属していた。構造解析は、大腸菌由来酵素とアミノ酸配列を比較し、大腸菌酵素に余分に付加されているドメインを削除して分子置換法で行った。一次構造のホモロジーは約 20% と高くはなかったが、分子置換法で解を得ることができた<sup>(12)</sup>。構造解析結果を表 1 に示す。

### AGAO の結晶構造

AGAO の構造は、大腸菌酵素 (ECAO) と比較すると ECAO に存在するキノコの柄の部分欠損し、キノコの傘の部分のみである (図 2 上)。各サブユニットは、18 本の鎖から構成される サンドイッチ構造をもつコアドメインと、2 つの小さな  $\alpha$  ドメインから成り立っている。各サブユニットは長くのびた構造をもったアームが 2 本つきだしており、互いに相手のサブユニットを抱きかかえるようにしており、ちょうど相撲で四つに組んだ形になっている。これらのサブユニットの間には、外界から隔離された大きな溶媒領域が存在している。また、トパキノンや金属結合部位は、分子の奥深くに存在しており、直接タンパク質外部に存在する分子と接触できないようになっていた。反応性に富むトパキノンの様な化学種を外部に露出させないのは極めて合理的である。この分子の奥深くに存在する活性部に基質を導くため、タンパク質表面から活性部位に至る基質チャンネルが存在していることも明らかになった。このチャンネルはアミン類のような正電荷を帯びた分子を引きつけるために、酸性残基に富んだ入口を持っている。

アポ型、ホロ型 AGAO は、主鎖構造のレベルでは、基本的に同一であった。すなわ

ち、トパキノン生成過程で、大きなコンフォメーション変化が起こらないことが示唆された。また、ほとんどのアミノ酸残基に関しても、大きな構造変化は観測されなかった。これに対して、トパキノンが生成する活性部位近傍では、前駆体チロシン残基とトパキノン、ホロ型で銅イオンが配位しているヒスチジン残基、さらに

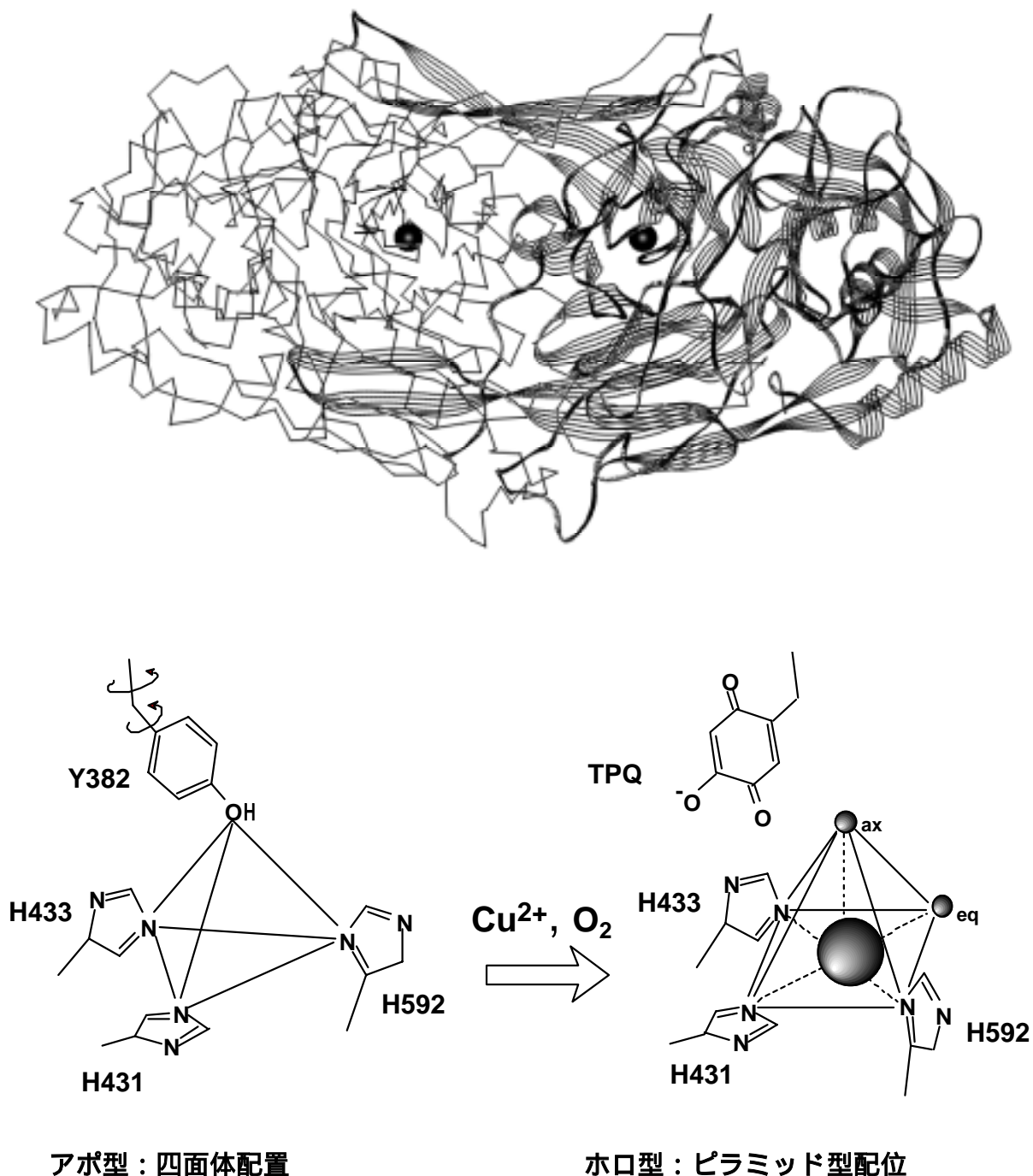


図2 AGAO二量体の結晶構造および活性部近傍の構造模式図

近傍の水分子の配置に違いがあることが明らかになった。図にアポ型およびホロ型

の活性部近傍の構造模式図を示す(図2下)。ホ口型の構造では銅イオンは3つのヒスチジン残基(His431、His433、His592)の窒素と面配位の水分子によって平面四配位され、さらに軸配位の水分子を伴って歪んだピラミッド型構造をとっていることが明らかになった。トパキノン中の水酸基は銅イオンとは異なった方向を向いていた。アポ型酵素では、当然銅イオンは存在せず、His592の優勢なコンフォメーションもホ口型において優勢なコンフォメーションとは逆であった。前駆体 Tyr382は、その水酸基の酸素がホ口型における軸配位の水の位置に来るように1部分で回転していた。すなわち、3つのイミダゾール窒素とTyr382の水酸基は、四面体の配置をとっている事になる。

我々は、この段階において、まず反応機構を推定することを試みた。平面四配位構造を持つ2価の銅イオンは酸化還元電位が低く、酸素を活性化する力もないと考えられる。しかし、配位構造の平面性が崩れて行くに従い、酸化還元電位が上昇し酸化力が強くなる。アポ型酵素の構造は、まず銅イオンがアポ酵素に結合する時に、3つのイミダゾール窒素とTyr382の水酸基が形作る四面体構造の中心にまず結合することを示唆する物であった。すなわち、2価の銅イオンは、アポ型酵素に最初に結合する時には四面体配位構造をとり、銅イオンの配位構造の平面性は崩れていると予測した。その後、銅イオンが分子状酸素を活性化してチロシン環を攻撃し、ドーパキノン生成する。さらに、溶媒の水分子がドーパキノン生成を攻撃し、還元型のトパキノン(トパ)を経てトパキノン生成するというものである。

#### 時系列に沿った反応中間体の構造解析

アポ型とホ口型を共に構造決定することによって、トパキノンの生成機構を提唱することができた。次の段階として、本当にこのような機構で反応が進んでいるのかを検証する必要がある。たとえば、酸素が存在しないと前駆体チロシンと銅イオンは相互作用しないという反応機構も他のグループによって提唱されており、議論が必要であった。また、反応中間体のドーパキノンは、その反応機構から提唱されているが、分光学的手法によってもその存在は確認されていない。そこで、提唱された反応機構を作業仮説として、トパキノン生成機構を時間分割構造解析によりより詳細に確実に解明する事に着手した<sup>(13)</sup>。初期段階では、回折強度データ収集にラウエ法の適用も考え、単斜晶系結晶を用いてラウエ法の予備実験を試みたり、より対称の高い結晶を得るための条件検索を行った時期もあったが、最終的に低温トラップによる方法を用いることとして研究を進めた。反応のトリガーとしては、銅イオン拡散、酸素分子の拡散、もしくは両者の拡散を用いる事にして予備実験を行った。最終的な戦略として、まず無酸素条件下で銅イオンのみが結合した中間体をつくり、その銅・アポ型結合型中間に酸素を拡散することによって反応を進行させることにした。

#### 試料調製および嫌気条件下での結晶化

完全に銅イオンを除去した条件下で菌体培養、タンパク質精製を行いアポ型酵素として精製試料を得、結晶化に用いた。本酵素の結晶は浸透圧変化に対して弱く、結晶化は微量透析セルを用いた透析法で行った。試料溶液以外の実験に用いた全ての溶液は真空引きとピロガロールアルカリ溶液を通したアルゴンのバブリングによって酸素を除去したものをを用いた。また、全ての操作は、真空引きとアルゴン充填を数回繰り返したグローブボックス中において行った。このグローブボックス中には、ピロガロールアルカリ溶液を入れたビーカーを内部に置いて、残っている酸素を吸収させた。

10mg/ml のアポ型アミン酸化酵素溶液を微量透析セルに入れ、1.05M の酒石酸ナトリウムカリウム溶液に透析するようにセットし、容器を密閉した。この密閉容器を、さらにピロガロールアルカリ溶液を入れたバイアルと共に密閉した容器中に入れ 20 日に保ち、結晶の析出を待った。

### 結晶中での反応の進行と中間体トラップ

結晶が得られた後、グローブボックス中において、完全脱気した 10mM の硫酸銅と 45% のグリセロールを含んだ母液に結晶を透析セルごと移し、24 時間ソーキングし、アポ酵素に銅イオンが結合した中間体を含む結晶の作製を試みた。この結晶を、グローブボックス中において、液体  $\text{CF}_4$  を用いて冷却した (Bio-1-AGA0)。

酸素に依存した反応の進行は、上記と同様の方法で作成した銅イオンと結合したアポ型結晶を空气中で飽和させた母液に移す事によって行った。空気飽和の母液に移してから、種々の時間結晶を保った後、低温窒素気流によってフラッシュクーリングを行い、反応中間状態のトラップを試みた。フラッシュクーリングを行った結晶は顕微分光を行い、トパキノン生成の有無を確認した。最終的に、構造解析には、空気飽和の母液に 10 分間 (Bio-2-AGA0) および 100 分間 (Bio-3-AGA0)

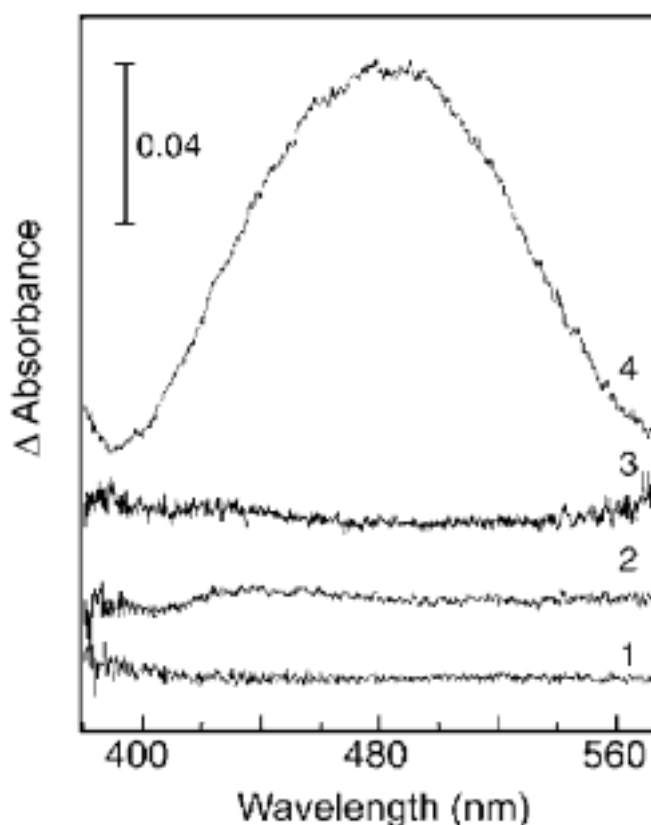


図3 各結晶の顕微分光の結果  
1:Bio-1-AGA0, 2:Bio-2-AGA0, 3:Bio-3-AGA0, 4:Holo-AGA0である。

ソーキングした物を用いた。さらに、反応が完結してトパキノンが生成し、ホ口型となった結晶を作製する目的で好気条件下に 3 日間保った結晶も作製した。この最後の結晶は、肉眼でも赤みを帯びていることがわかり、低温窒素気流によってフラッシュクーリングを行った (Holo-AGAO)。

図 3 に、それぞれの結晶の顕微分光の結果を示す。Holo-AGAO では、480nm に極大を示す吸収を示し、結晶中でトパキノンが生成していることがわかった。他 3 種類の結晶は、いずれも吸収を示さずトパキノンが生成していないことが確認できた。

### 反応中間体の構造解析

それぞれの結晶の回折強度データ収集は、Spring8 の BL44XU と BL44B2 を用いて 0.7 の波長で行った (表 1)。先に述べた、室温でのアポ型、ホ口型結晶のデータ収集時と異なり、結晶学的 2 回軸と分子中の 2 回軸がずれ、結晶の単位格子の体積は 2 倍となり、非対称単位中に 1 つの二量体分子が存在するようになった。室温型結晶と構造の比較を容易にするため低温型結晶の空間群を  $I2$  ととり解析を進めた。

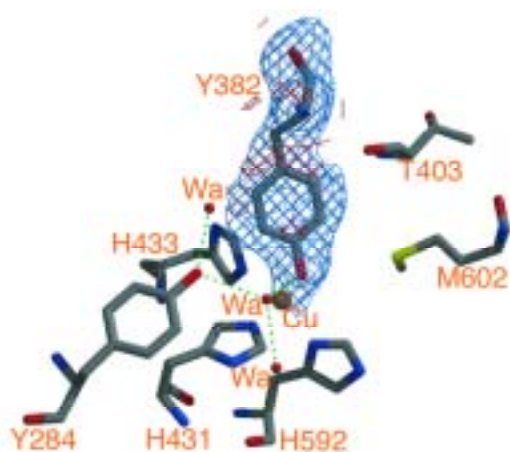
表 1 データ収集および構造精密化

	アポ型	ホ口型	Bio-1-AGAO	Bio-2-AGAO	Bio-3-AGAO	Holo-AGAO
データ収集						
X線源 <sup>1)</sup>	回転対陰極	BL6A2	BL44XU	BL44B2	BL44B2	BL44B2
波長 / Å	1.54	1.00	0.70	0.70	0.70	0.70
検出器	Rigaku R-AXIS IV	Weissenberg Camera/IP	OXFORD PX210	MAR CCD 165	MAR CCD 165	MAR CCD 165
温度 / K	室温	室温	100	100	100	100
$R_{\text{merge}}$	0.065	0.085	0.081	0.073	0.077	0.044
独立反射数	39,585	33,778	140,354	65,490	120,950	98,905
完全性 / %	87.3	90.1	98.7	81.3	98.2	99.7
格子定数						
$a$ / Å	158.7	158.7	157.9	157.8	157.0	158.0
$b$ / Å	64.6	64.6	63.2	63.1	62.9	63.2
$c$ / Å	93.3	93.3	184.3	183.5	182.9	184
$\beta$ / °	112.3	113.5	111.8	111.6	111.8	111.7
空間群	$C2$	$C2$	$I2$	$I2$	$I2$	$I2$
精密化						
分解能 / Å	50.0 - 2.2	8.0 - 2.2	7.0 - 1.9	7.0 - 2.1	7.0 - 1.9	10.0 - 2.2
$R$	0.194	0.200	0.199	0.189	0.209	0.217
$R_{\text{free}}$	0.237	0.241	0.258	0.263	0.262	0.292

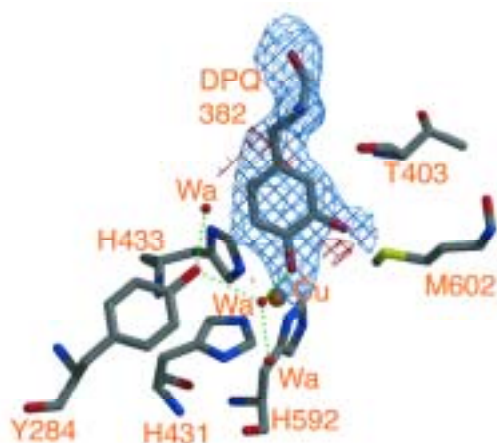
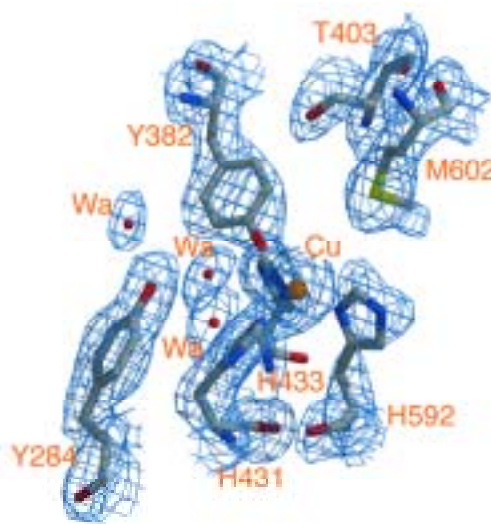
1) BL6A2 は PF、BL44XU、BL44B2 は Spring8。

室温で解析したホロ型分子を結晶学的 2 回軸で回転させて二量体分子を発生させ、まず Bio-1-AGAO の精密化を行った。ただし 382 番目のアミノ酸残基はチロシンとして行った。Bio-1-AGAO のデータセットに対し、二量体として剛体近似精密化を行った後、シミュレーテッドアニーリング、原子位置、温度因子の精密化を行った。Bio-1-AGAO では、予想通りアポ型構造の 3 つのイミダゾール窒素と前駆体チロシン Tyr382 の水酸基が四面体を作り、その中心部分に金属に相当する大きな電子密度が観測された。この電子密度中に銅原子を置いて精密化を進めた (図 4a)。

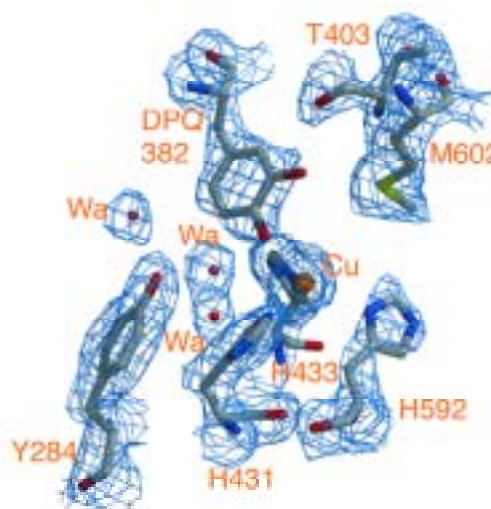
Bio-2-および Bio-3-AGAO の精密化は、Bio-1-AGAO の水分子を除いた構造を初期モデルとして精密化を行った。シミュレーテッドアニーリング、原子位置、温度因子の精密化、マニュアルリビルディング、水分子の同定などを繰り返して精密化を進めた後、382 番のアミノ酸残基の検討を行った。Bio-2-AGAO では、差フーリエ図中に、チロシン残基と置いた C3 位の近傍、C3 と共有結合距離に 3 レベルのピークが現れた。このピークが反応で最初に付加された酸素原子であると解釈した。この



a. Bio-1-AGAO



b. Bio-2-AGAO





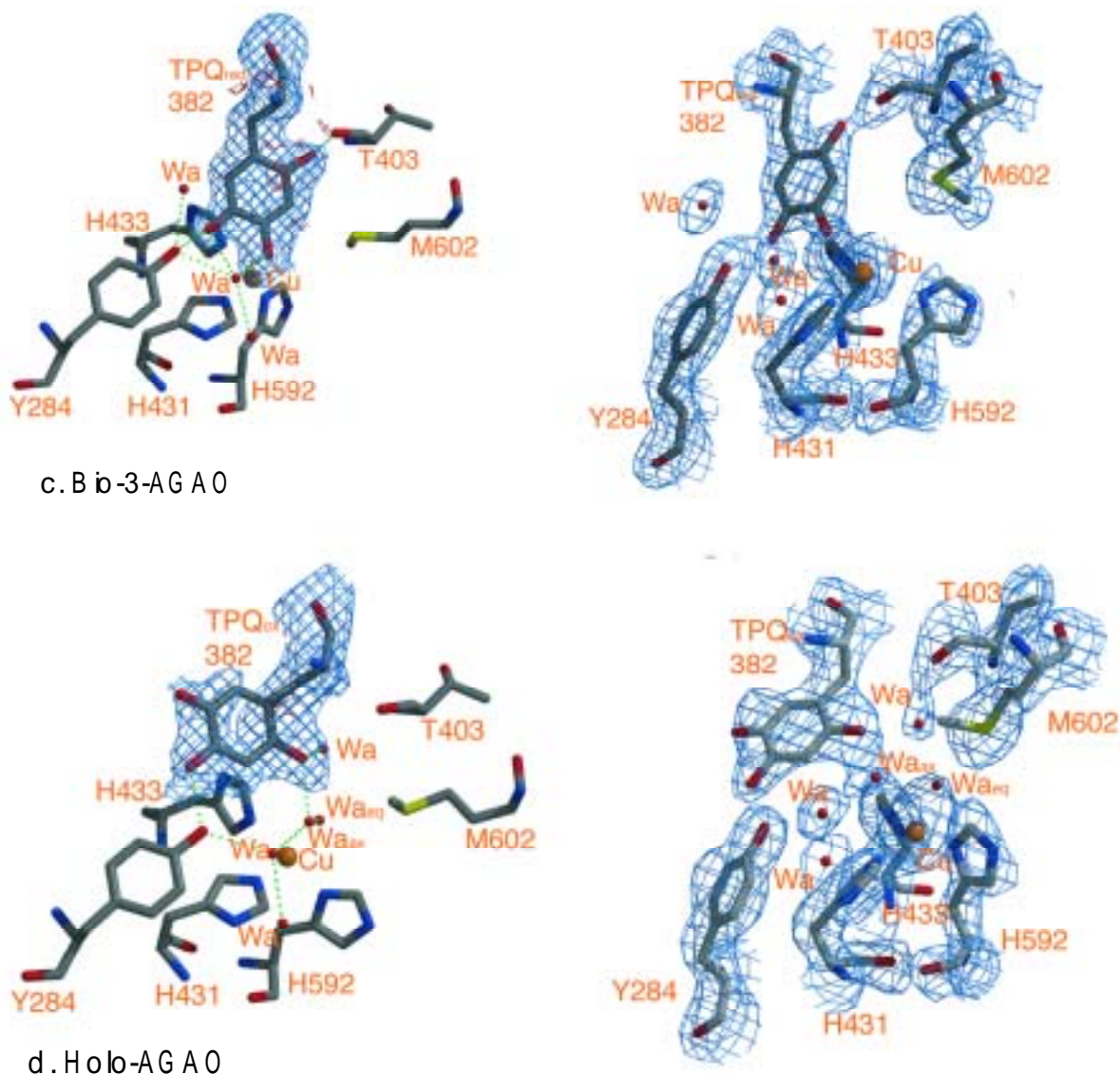


図4 各最終モデルと残基 382 番の Annealed Fo-Fc omit map(左)と2Fo-Fc map(右)との重ね合わせ図

TPQ<sub>ox</sub> は、トパキノン、TPQ<sub>red</sub> は還元型トパキノン(トパ)を示す。また、Wa<sub>ax</sub> は軸配位の水を示し、Wa<sub>eq</sub> は面配位の水を示す。

酸素原子が水酸基かカルボニルかはこの分解能の X 線解析では決定できなかったが、反応機構を考えると還元されている構造を経由するとは考えられず、382 番をドーパキノンであるとして構造の精密化を進めた。2Fo-Fc、アニールドオミットマップ、差フーリエなど種々の電子密度図を比較検討して(図 4b)、最終的に酸素の占有率が 0.5 であるとして、占有率 0.5 のドーパキノンと占有率 0.5 の前駆体チロシンが混ざっていると結論づけた。

Bio-3-AGAO の精密化も Bio-2-AGAO と同様に行い、差フーリエでチロシン残基の C2 位と C5 位の近傍に 2.8 レベルのピークが現れた。この部分に酸素原子を置くと、382 番のアミノ酸はトパキノンもしくは、トパキノンの還元型であるトパという事になる。C2 位の酸素原子は、Thr403 の主鎖のカルボニル酸素と水素結合距離にあり、

この化学種がトパキノンであれば互いにカルボニル酸素であり水素結合を作り得ない。また、X線実験前に行った顕微分光実験においても、Bio-3-AGA0 結晶にトパキノンの生成は認められなかった。これらの事から、Bio-3-AGA0 中での 382 番のアミノ酸の化学種はトパであるとして構造の精密化を進めた (図 4c)。

Holo-AGA0 は、顕微分光の結果からも明らかのように、トパキノンが生成しているものとして精密化を行った (図 4d)。

## トパキノン生成に伴う構造変化およびトパキノン生成の反応機構について

今までに解析された室温でのアポ型酵素、ホロ型酵素、無酸素条件下での銅イオン結合アポ型 (Bio-1-AGA0)、低温トラップによるドーパキノン型 (Bio-2-AGA0)、トパ型 (Bio-3-AGA0) の構造を基に反応機構をかなり詳細に議論することができるようになった。図 5 はこれらの構造および分光学的な実験データなどを考慮して提唱した反応機構を示している。

まず、前駆体アポ型の構造では、3つのヒスチジンのイミダゾール窒素と Tyr382 の水酸基が四面体の配置をとっている (図 5A)。基質チャンネルは入口が負電荷を帯びていると前に述べたが、銅イオンもこの負電荷に引きつけられ、このチャンネルを通り、効果的に分子内部の金属結合部位に効果的に到達するものと考えられる。銅イオンが活性部位に到達すると、まず先の四面体の中心に結合し、銅イオンは四面体の配位構造をとる (図 5B)。さらに、溶液中においても銅イオンの配位環境が結晶中で決定したものと等価であることを EPR スペクトルの手法を用いて確認した。この配位環境では、銅イオンは平面四配位構造をとらないので酸化還元電位が上昇し、チロシン環から電子を引きつける。分子状酸素は、1 価に近い状態になった銅イオンによって活性化され (図 5C、D)、チロシン環を攻撃し、ドーパキノン生成する (図 5E)。図 5E から F の段階で、382 番残基の環の反対側が銅イオン側を向くために、ドーパキノン環の 2 角が  $180^\circ$  近く回転を起こすと考えられる。トパキノンの C2 位の酸素原子は、溶媒の水に由来するので、溶媒の水から生じた水酸化物イオンが銅イオンに結合し中間体 F を形成する。この水酸化物イオンがドーパキノンの C2 位を求核攻撃し、還元型トパキノンであるトパが生成する (図 5G)。最後のトパからトパキノンへの酸化過程において、1 角が回転し、トパキノンが銅イオンから離れたコンフォメーションをとる。この時には、コンセンサス配列の Asn381 がチロシンの後ろ側に存在し、このコンフォメーションの安定化に寄与していると考えられる。銅イオンは、配位構造を変化させながら酸素の活性化を行うだけでなく、反応物の位置関係、すなわち、酸素もしくは過酸化物、水または水酸化物イオン、チロシンの位置を規定しているともいえるであろう。

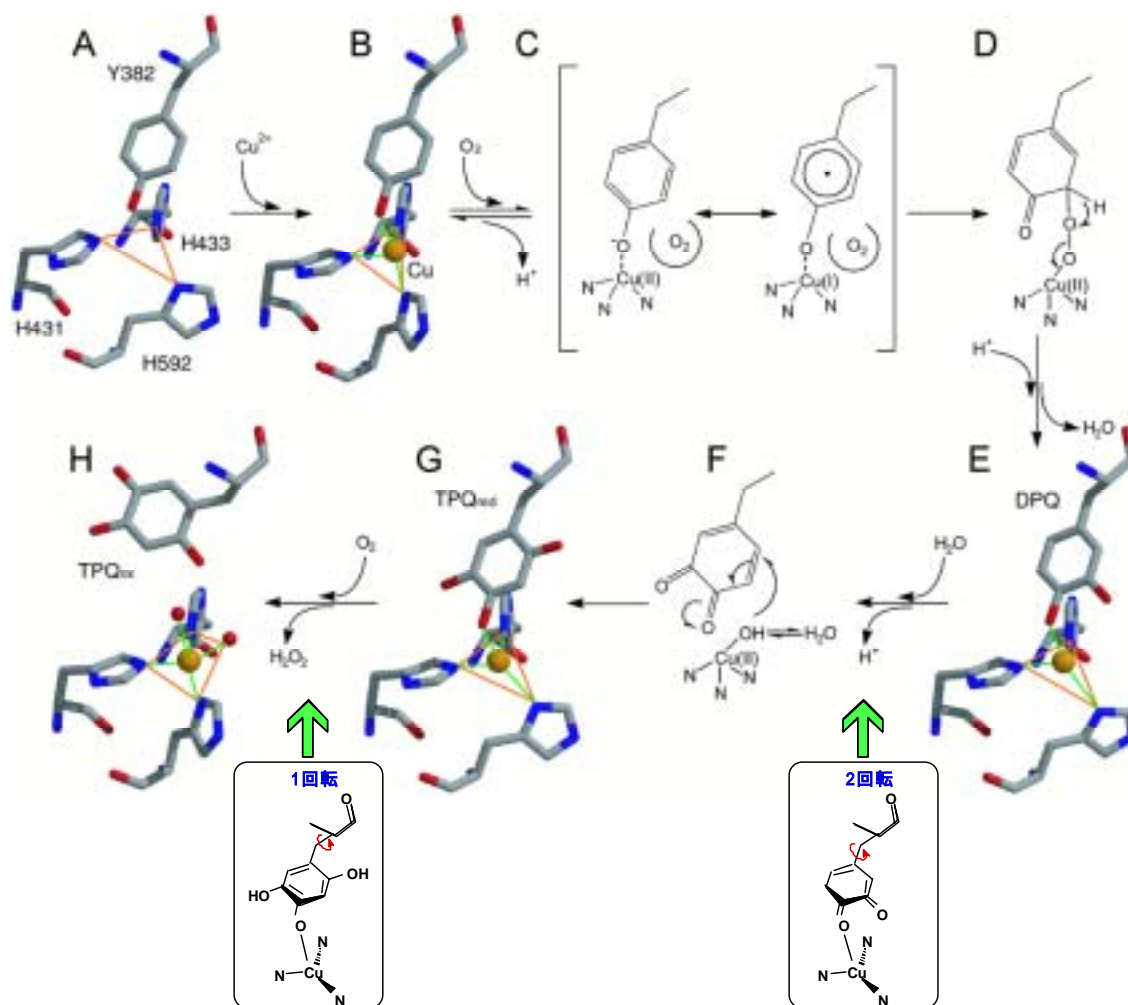


図5 アポ型、ホロ型構造、反応中間体構造を基に予測したトパキノン生成機構  
分子モデルが示してあるものは、構造決定されたものを示す。それぞれ、A : アポ型(室温)、B : Bio-1-、E : Bio-2-、G : Bio-3-、H : Holo-AGAO である。

終わりに

今回述べたように、土壌菌由来のアミン酸化酵素のアポ型・ホロ型両者の立体構造の決定を行い、さらにアポ型酵素中のチロシンから、活性ホロ型中のトパキノンへの自動酸化過程の構造変化の追跡に成功した。これらの結果からかなり詳細にトパキノン生成機構を議論することが可能になってきた。現在、本酵素の銅イオンの役割を明らかにするために、銅の配位子である His の部位特異的変異体の構造解析や銅以外の金属イオンに置換した結晶の構造解析、さらに活性化反応で消費される酸素の結合部位を見つけるためにキセノン原子をプローブとした構造解析を進めている。これらの結果を解釈し、銅イオンの役割やトパキノンの生成のより詳細な機構を明らかにしていくためには、速度論的解析や分光学的解析の結果と共に考察していく必要があり、種々の分野の研究者の共同研究も進行している。このような、種々

の分野の結果の蓄積によって、さらに興味深い結果が近い将来得られるであろう。

本研究は、大阪大学産業科学研究所の谷澤克行先生、岡島俊秀先生との共同研究として遂行してきたものである。アポ型酵素とホロ型酵素の構造決定時には、坂部貴和子先生のお口添えもあり、オーストラリア、シドニー大学のFreeman教授、Guss博士らとの共同研究にも発展した。また、今回の原稿では詳しくはふれなかったが関西学院大学理工学部河盛阿佐子教授に、ESRスペクトルの測定にお世話になった。結晶中での反応の進行の確認における顕微分光では、理化学研究所播磨研究所の足立伸一博士にお世話になった。また、理化学研究所共同研究員という立場も利用させていただいた。この場を借りて、これらの方々や理研の関係者の方々にお礼を述べたい。低温トラップを用いた中間体構造の研究は、この7月に学位を取得した金美沙博士の忍耐強い実験・考察が無くては成し遂げられなかったものである。また、本研究には、関西学院大学理学研究科に在籍した吉村めぐみさんや、私の研究室を学部のみで卒業した学生さんたちの多大な努力が大きく寄与していることを付け加えたい。最後に、本稿執筆の機会を与えて下さった坂部知平先生、坂部貴和子先生にお礼の気持ちを表して結びとする。

#### 参考文献

- (1) Janes, S.M. *et al. Science* **248**, 981–987 (1990).
- (2) Wang, S.X. *et al. Science* **273**, 1078–1084 (1996).
- (3) McIntire, W.S. *et al. Science* **252**, 817–824 (1991).
- (4) Datta, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14268–14273 (2001).
- (5) Satoh, A. *et al. J. Biol. Chem.* **277**, 2830–2834 (2002).
- (6) Matsuzaki, R. *et al. FEBS Lett.* **351**, 360–364 (1994).
- (7) Matsuzaki, R. *et al. Biochemistry* **34**, 4524–4530 (1995).
- (8) Ruggiero, C.E. *et al. Biochemistry* **36**, 1953–1959 (1997).
- (9) Nakamura, N. *et al. J. Biol. Chem.* **271**, 4718–4724 (1996).
- (10) Parsons, M.R. *et al. Structure* **3**, 1171–1184 (1995).
- (11) Kumar, V. *et al. Structure* **4**, 943–955 (1996).
- (12) Wilce, M.C. *et al. Biochemistry* **36**, 16116–16133 (1997).
- (13) Kim, M. *et al. Nature Struct. Biol.* **9**, 591–596 (2002).