

総 合 論 文

ビタミン B₆ の新機能および B₆ 代謝酵素に関する研究*

高知大学農学部農学科食料科学**

八木 年晴

Vitamins (Japan), 82 (2), 87-99 (2008)

Study on Novel Function of Vitamin B₆ and on Enzymes Involved in Metabolism of Vitamin B₆

Toshiharu Yagi

Food Science Course, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Kochi 783-8502

Vitamin B₆, consisting of natural six forms, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine and their 5'-phosphate forms, functions as the essential nutrient through supporting the enzymes involved in metabolisms of amino acids and others as a coenzyme. They nutritionally show the same efficiency, because they can be interchangeable through a salvage pathway to form the coenzyme form, pyridoxal 5'-phosphate. In contrast, recent works show that the individual form has a specific function, such as anti-active carbonyl and antioxidation ones. We have found that vitamin B₆ compounds protected fission yeast cells against oxidative death more efficiently than vitamin C, and inhibited tyrosinase reaction by scavenging reactive oxygen specie(s) essential for the enzyme reaction. The genes encoding enzymes involved in the metabolism of vitamin B₆ compounds were identified, and structures and functions of the enzymes were elucidated. Pyridoxal reductase in the fission yeast cells was a new member of aldo-keto reductase superfamily, and suggested to be involved in an efflux system of pyridoxal after reducing to pyridoxine. All of genes involved in the degradation for vitamin B₆ were identified. They located on a chromosome of *Mesorhizobium loti*, a nitrogen-fixing symbiotic microorganism, as a cluster. The enzymes were over-expressed and characterized. *E. coli* cells containing the high amount of the enzymes were used for bioconversion of pyridoxine to 4-pyridoxolactone. Three of the enzymes were applied to a new individual determination method of vitamin B₆ compounds.

Key words: vitamin B₆, new function, pyridoxine degradative enzymes, *Mesorhizobium loti*, pyridoxal reductase

(Received August 17, 2007)

1. はじめに

ビタミン B₆ (B₆) は 1934 年に Paul György によって、ラットの抗皮膚炎因子として発見された。4 年後には、わが

国を含めて 5 カ国で、B₆ であるピリドキシンが米ぬか等から単離された。さらにその 4 年後 Esmond E. Snell はピリドキサルとピリドキサミンが B₆ として機能することを報告した。それから数年間で、Irwin C. Gunsalus,

*本論文は日本ビタミン学会第 59 回大会 (平成 19. 5.24. ~ 25 佐世保市) における学会賞受賞講演の内容をまとめたものである。

**〒 783-8502 高知県南国市物部乙 200

Esmond E. Snell, Alexander E. Braunstein 等により, 各々のリン酸エステル型が存在し, この内ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) が補酵素型であることが報告された. すなわち, 天然には, 図 1 に示す 6 種類の B₆ 化合物が存在する. これら化合物を総称して, B₆ という. また, 植物中にはピリドキシンの配糖体であるピリドキシン-β-グルコシドが存在する. これは B₆ の貯蔵型であるとされ, B₆ とはされない.

B₆ は, アミノ酸や糖の代謝に関与する B₆ 依存性酵素の補酵素となり, 栄養機能を発揮する¹⁾. 6 種類の B₆ 化合物は, 体内で, サルベージ経路により, PLP へと転換されるため, 全てが等しい栄養機能を持つ. 一方, 最近になって, B₆ が栄養機能以外の様々な機能を持つことが明らかにされてきている. ホルモン等の生合成に関わる遺伝子の発現を調節する機能²⁾, 一重項酸素の働きを抑える抗酸化機能³⁾, 大腸がん等の増殖を抑える抗がん機能⁴⁾, 糖尿病合併症の原因物質である活性カルボニル化合物を無毒化する抗活性カルボニル機能⁵⁾, 抗菌機能などである. これらの新たに見出されてきた機能については, 6 種類の B₆ 化合物が必ずしも等しい有効性を示すことはなく, 各々が特異的に機能するという特徴がある.

2. B₆ の抗酸化機能

B₆ が抗酸化機能, 特に, 一重項酸素のスカルベンジャーとなることを見出したのは, Marilyn Ehrenshaft 等³⁾である. 彼女たちは B₆ 生合成に必須の酵素, PLP 合成酵素を欠損している植物病原性のカビが, 光照射により生ずる一重項酸素により死滅してしまうことを示した. さらに, 一重項酸素と B₆ 化合物が試験管内で反応することを示し⁶⁾, B₆ が抗酸化剤として機能することを明らかにした. そこで, 我々は活性酸素による分裂酵母細胞の死滅に対する

B₆ 化合物の保護効果を調べた⁷⁾. 分裂酵母細胞は, 栄養培地中に 1 mM のメナジオン (ビタミン K₃) を添加すると, メナジオンによって発生する活性酸素により全く増殖できなかった. しかし, 同濃度の B₆ 化合物を添加すると増殖できるようになった. その効果は, PLP ≧ ピリドキサミン 5'-リン酸 > ピリドキサミン > ピリドキサル ≧ ピリドキシンであった. PLP, ピリドキサミン 5'-リン酸, ピリドキサミンは同濃度のビタミン C よりも強い効き目を示し, ピリドキサルとピリドキシンはビタミン C と同程度の効果を示した. 一番強い保護効果を示した PLP を用いて保護機構を調べた. 表 1 に示すように, 分裂酵母細胞中のグルタチオン濃度はメナジオン処理により大きく減少し, チオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) の量が増大し, 生存率が著しく低下した. これは, 分裂酵母内で, 活性酸素がグルタチオン濃度を減少させ, 脂質の過酸化反応が進行し, 生存率を低下させたことを示している. 一方, 同濃度の PLP を共存させるとグルタチオン濃度の低下が減少し, TBARS の上昇も抑え, 生存率を上げることがわかった. PLP が活性酸素と拮抗して酵母を保護していることがわかる. また, 実験に用いた酸素感受性株は, 最終的にカタラーゼの誘導にいたるリン酸リレー系の遺伝子群のうちの一つを欠損しているために酸素感受性になっている. PLP はこの菌株でも有効であった⁷⁾ことから, PLP による抗酸化機構は, この経路とは関係なく, グルタチオンの関与する抗酸化システムに依存していると予想された.

B₆ が黒色色素メラニンの生合成に関与する酵素チロシナーゼの活性を阻害することを見出した. そして, この阻害が, B₆ の抗酸化機能に基づいていることを強く示唆する結果を得た⁸⁾. きのこと由来のチロシナーゼは L-ジョキシフェニルアラニンをドーパクロームに転換するジ

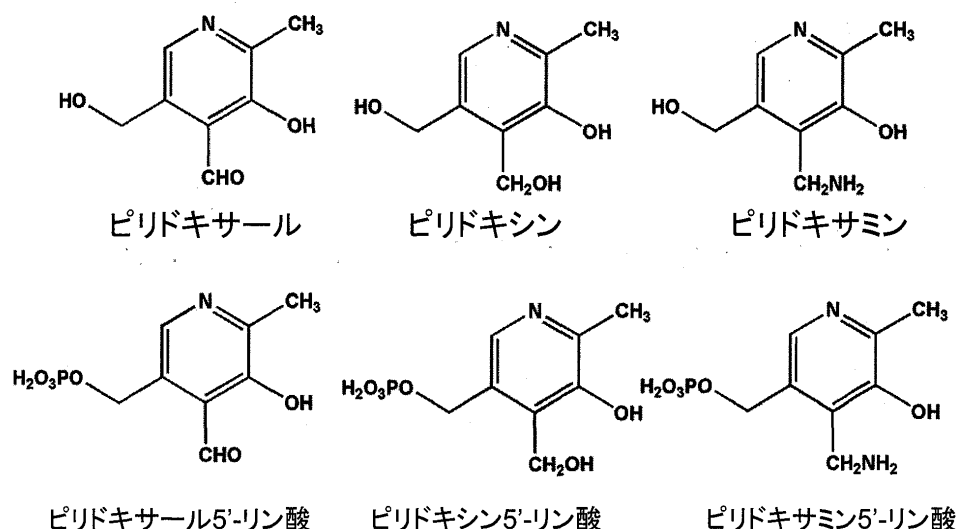


図 1. 自然界に存在するビタミン B₆

フェノラーゼ活性を有する。ピリドキサル、ピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサミン5'-リン酸は、この活性を阻害した。ピリドキサミンが最も強い阻害を示し、1.5 mMで約40%活性を低下させた。K_iは4.3 mMで、IC₅₀は4.2 mMであった。このピリドキサミンによる阻害の様式は混合型であり、活性部位で基質であるチロシンの結合を阻害しているのではなく、酵素反応が進行した後の段階で生じる中間反応段階で反応を阻害していると予想された。また、ピリドキサミンはホルミル基を有し

ていないので、酵素のアミノ基とシッフ塩基を作ること、で、反応を阻害するとは考えられなかった。むしろ、ピリドキサミンの抗酸化力によるのではないかと思われた。そこで、各種の代表的活性酸素クエンチャーによる本酵素に対する阻害を調べた。表2に示すように、一重項酸素を特異的にクエンチする化合物はいずれも本酵素の活性を阻害した。また、スーパーオキシドと反応することが知られているプロキシルフルオレスカミンも阻害したが、ヒドロキラジカルのクエンチャーによっては阻害を

表1. 分裂酵母に酸化ショックを与えた時のPLPによる保護効果

菌株	処理	総グルタチオン含量 (nmol/g, 乾物)	TBARS* (nmol/g, 乾物)	生存率 (%)
酸素感受性株	無処理	13.0±0.6	144.7±1.4	100±0.0
	1 mM PLP	13.3±0.3	142.0±1.5	98±3.0
	1 mM MD	5.7±0.7	180.0±2.3	28±1.5
	1 mM PLP + 1 mM MD	9.0±0.3	167.7±1.3	55±2.5
ロイシン要求株	無処理	14.0±0.6	140.0±1.2	100±0.0
	1 mM PLP	13.7±0.9	138.0±1.6	99±2.8
	1 mM MD	8.3±0.7	162.0±1.0	40±2.0
	1 mM PLP + 1 mM MD	11.0±0.6	150.3±1.7	64±3.1

*TBARS: チオバルビツール酸反応陽性物質, MD: メナジオン

表2. 活性酸素クエンチャーによるチロシナーゼ活性の阻害

化合物	クエンチする活性酸素種	活性(%)
無し	—	100
ピリドキサミン (1.5 mM)	一重項酸素	62
ヒスチジン (10 mM)	一重項酸素	59
アジ化ナトリウム (30 nM)	一重項酸素	60
トロロックス (5 mM)	一重項酸素	32
AAP (1.5 mM)	一重項酸素	80
PFC (1.5 mM)	スーパーオキシド	60
DMSO (10 mM)	ヒドロキシラジカル	105
D-マニトール (10 mM)	ヒドロキシラジカル	100

AAP: anthracene-9,10-dipropionic acid, PFC: proxyl fluorescamine

受けなかった。これらの結果は、ピリドキサミンとその他の B_6 が、チロシナーゼ反応で生じ、反応を進めるのに必要な一重項酸素（スーパーオキシドの可能性もある）を奪うことで、本酵素反応を阻害していることを強く示唆した。 B_6 によるチロシナーゼの阻害効果は、コウジ酸などよく知られたチロシナーゼ阻害剤に比べて低いが、安全性がそれらに比べて非常に高い。したがって、適切な濃度のピリドキサミンを化粧品等に添加することは有用であると思われる。

3. B_6 のサルベージ経路に関連する酵素

B_6 は図2の点線で囲って示すように、細胞内で6種類の化合物が相互変換される経路、すなわちサルベージ経路によって、全てがPLPに変換され、栄養機能を果たすとされている。 B_6 を生合成できない動物細胞では、この経路が重要である。従来は、酵母等の微生物でも、最初にピリドキシンが合成されると考えられていたため、この経路がPLPの供給に役割を果たすと考えられてきたが、最近になって、酵母では、最初に、直接PLPが合成されることが明らかとなり⁹⁾、この経路はPLPの供給経路としての重要性は再評価が必要であろう。我々は、この経路に関与する酵素の中で、一次構造が明らかでなかったピリドキサルレダクターゼ (PLRED) 遺伝子を同定し、その一次構造を明らかにした¹⁰⁾。さらに、分裂酵母における本酵素の生理機能を検討した¹¹⁾。

PLRED は NADPH を補基質としてピリドキサルをピリドキシンに還元する。分裂酵母から、本酵素を均一に精製し、酵素化学的性質を明らかにした。さらに、リシルエンドペプチドとブロムシアンペプチドを精製し、アミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列と、ゲノム解析されている分裂酵母の遺伝子がコードするタンパク質の配列を相同検索した。その結果、D89205 として登録されていた機能未知のタンパク質と一致することがわかった。そこで、このタンパク質をコードする遺伝子をクローン化し、大腸菌で発現系を構築した。組換え酵素を均一に精製し、性質を調べたところ、野性株由来の PLRED と同一であった。これから、本遺伝子が PLRED をコードすることが明らかになった。この酵素の一次構造はアルド-ケトレダクターゼ (AKR) スーパーファミリーのそれと相同であったが、相同性はそれほど高くなく、最も高い相同性を示した K^+ チャンネル β -2 サブユニットでも 18.5% と低い値を示した。しかしながら、AKR に共通してみられる NADPH 結合残基や活性部位に存在するアミノ酸残基は保存されていた。これらの結果から、PLRED は AKR スーパーファミリーの中で、新たなファミリー (AKR8) をなす酵素 (AKR8A1) であることがわかった。図3に AKR スーパーファミリーの酵素の無根系統樹を示した。

次いで、本酵素の分裂酵母内での機能を明らかにするため、遺伝子破壊株を作製した。本酵素遺伝子 *plr1*⁺ 内部

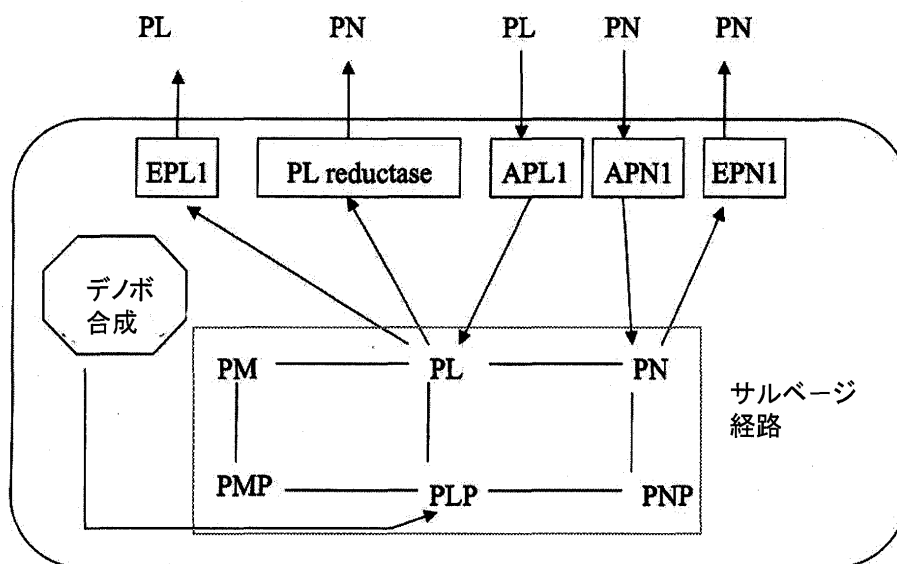


図2. ピリドキサルレダクターゼ (PL reductase) の推定機能

PN: ピリドキシン, PM: ピリドキサミン, PL: ピリドキサル, PNP: ピリドキシン5'-リン酸, PMP: ピリドキサミン5'-リン酸, PLP: ピリドキサル5'-リン酸, EPL1: ピリドキサル排出系1, EPN1: ピリドキシン排出系1, APL1: ピリドキサル能動輸送系1, APN1: ピリドキシン能動輸送系1. ピリドキサルレダクターゼはピリドキシン排出系の一つに関与すると思われる。ただ、菌体内のピリドキシン濃度が高い場合に働く別の排出系 (EPN1) が存在する¹⁴⁾。ピリドキサル排出系 (EPL1) は報告されておらず、あくまでも推定である。ピリドキシン能動輸送系はナトリウム¹²⁾あるいはプロトン¹³⁾共輸送系であると思われる。なお、ピリドキシン、ピリドキサル、ならびにピリドキサミンを同一のトランスポーター (Bsu1p) が取り込むという報告がある¹³⁾。また、サルベージ経路として示した反応の中で、遊離型ビタミン B_6 の間での相互変換反応は、動物細胞では確認されていない。

に *ura4⁺* 遺伝子を挿入し、遺伝子を破壊した。本破壊株は YNB 培地、EMM 培地で野生株と同じように良好に増殖した。ただ、本破壊株は、EMM 培地で増殖させると定常期後期に細胞の凝集体を作る傾向があった。理由は不明である。本破壊株は野生株に比べ、0.08%の PLRED 活

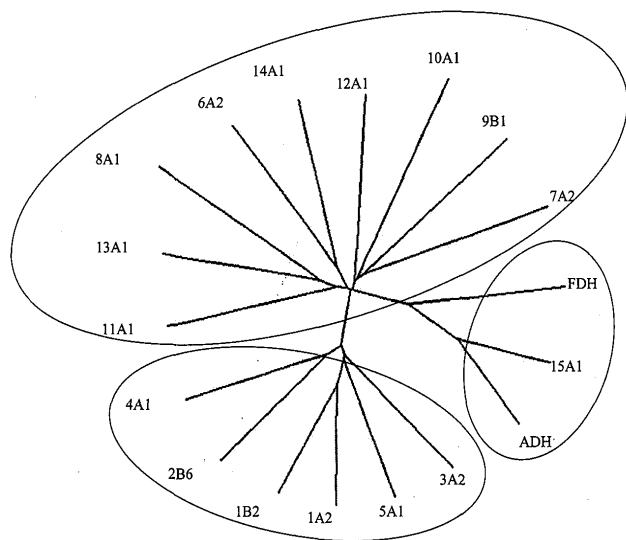


図3. アルドケトレダクターゼ (AKR) スーパーファミリーの酵素の無根系統樹

1A2: Aldehyde reductase, 1B2: Aldose reductase, 2B6: Gre3p, 3A2: 2-Methylbutylaldehyde reductase, 4A1: NAD(P)H dependent 6'-eoxychalcone synthase, 5A1: Reductase, 6A1: Shaker channel β -subunit, 7A2: Human aflatoxin aldehyde reductase, 8A1: Pyridoxal reductase, 9B1: Aryl-alcohol dehydrogenase, 10A1: Bluensomycin akr, 11A1: Vegetative protein 147, 12A1: NDP-hexose-2,3-enoyl-reductase TylCII, 13A1: YakC aldo-keto reductase, 14A1: *E. coli* aldehyde reductase, 15A1: Pyridoxal dehydrogenase, FDH: L-Fucose dehydrogenase, ADH: D-Arabinose dehydrogenase. 図下部の楕円で囲った AKR は主として動物に存在する。上部の楕円で囲った酵素は主として微生物に存在する。右下の楕円で囲ったのはピリドキサルレダクターゼとその関連酵素が属する第三のブランチである。

性を示した。非常に低い活性であるが、酵母細胞内で、ピリドキサルをピリドキシンに転換することは可能であり、ピリドキサルを取り込んで、ピリドキシンに転換することはできた。破壊株と野生株の細胞内の B₆ 化合物の含有量を測定すると、破壊株中の総 B₆ とピリドキサミン 5'-リン酸の量が野生株に比べ、有意に低下していた。両株で、総 B₆ 量に占める PLP の割合に差は無かった。培地中のピリドキサル濃度は破壊株で有意に増大し、逆に、培地中のピリドキシン濃度は破壊株で有意に減少した。両株によるピリドキサールの取り込みと、取り込んだピリドキサルがその他の B₆ に転換されるかを調べた。表3に示すように破壊株は野生株に比べ、6.1 倍ものピリドキサルを菌体内に蓄積した。一方、ピリドキシンの蓄積量は両株で変わらなかった。これらの結果は、PLRED がピリドキサールの排出に関与していることを強く示唆した。すなわち、PLRED はピリドキサルをピリドキシンに還元し、菌体外に排出していると思われた。PLRED は膜表面性の酵素であることもこの可能性を支持する。図2に示すように、分裂酵母にはピリドキシンの能動輸送系⁽¹²⁾⁽¹³⁾と排出系⁽¹⁴⁾が存在している。ピリドキサールの輸送系⁽¹³⁾と、実態は不明であるが、排出系も本論文の結果から存在が予想される。PLRED はピリドキサルをピリドキシンに転換して排出をしているという点でユニークである。分裂酵母細胞中にアルデヒド基を持つ、ピリドキサル以外の毒性の強い化合物があり、これを還元して排出している可能性も否定できない。

4. B₆ 分解経路に関与する酵素群

B₆ 分解経路は、Esmond E. Snell 博士の研究グループによって今から 20 年以上前にその存在が酵素的に明らかにされた。2 種類の分解経路が見出されており、経路 I は *Pseudomonas* MA-1 に存在し、9 種類の酵素が関与、一方、

表3. 野生株と破壊株によるピリドキサールの取り込みと菌体内ビタミン B₆ 化合物量の変化

菌株	保温時間(分)	PN	PL
野生株	0	0	0
	1	18.5±3.3	4.1±2.2 ^a
	2	34.8±4.5	6.0±1.8 ^a
破壊株	0	0	0
	1	17.4±1.8	25.2±4.1 ^b
	2	26.0±4.6	24.1±1.7 ^b

データは4回の実験の平均値と標準偏差を示す。数値に同じアルファベットを付してあるものはおたがいに有意差が無いことを示す。取り込まれた PN と PL による PM,PNP,PLP,PMP の菌体濃度の増加は無かった。

経路Ⅱは *Arthrobacter* sp. に存在し、5種類の酵素が関与する。図4に分解経路Ⅰの反応を示した。著者は24年前に、同先生の研究室で、分解経路Ⅰのちょうど中間段階である4番目の反応を触媒する膜酵素、4-ピリドキシン酸デヒドロゲナーゼを単離し、酵素学的性質を明らかにした¹⁵⁾。この経路はピリジン環の開裂を伴う興味深い経路であるが、最近までこれら酵素をコードする遺伝子と一次構造に関する研究は行われなかった。そこで、本経路の酵素群をコードする全ての遺伝子の構造を明らかにし、組換え酵素を用いてより詳細な酵素化学的性質を明らかにすることを目的として研究を開始した。さらに、本酵素群の応用法の開発と、遺伝子の局在性や発現調節機構の解明も目的とした。

ピリドキシンを資化することのできる細菌をスクリーニングし、*Ochrobactrum* sp. を得た。なお、本菌の名称は、以前、*Aureobacterium luteolum* あるいは *Microbacterium luteolum* と称したが、菌の同定を再度行い、*Ochrobactrum* sp. とした。本菌から1番目の反応を触媒するピリドキシン4-オキシダーゼ¹⁶⁾と2番目の反応を触媒するピリドキサル4-デヒドロゲナーゼ¹⁷⁾を精製し、酵素化学的性質を明らかにした。両酵素とも存在は知られていたが、精製酵素が得られたのは初めてであった。

Ochrobactrum sp. のピリドキサル4-デヒドロゲナーゼについては、アミノ末端ペプチドと内部V8ペプチドの配列から、プライマーをデザインし、PCRによって遺伝子を増幅し、さらにインバースPCRとカセット法により、

本酵素をコードする遺伝子 *pld1* の全長をクローニングした¹⁸⁾。大量発現株を作製し、組換え酵素を均一に精製し、性質を明らかにした。本酵素は、上述したピリドキサルレダクターゼと同じく、AKRスーパーファミリーに属する酵素であったが、図3に示すように、今までに知られていたAKR酵素と相同性は低く、固有のファミリー(AKR15)を成すことがわかった。さらに、AKRスーパーファミリーの酵素は、主として動物に存在するAKR1(たとえば1A1の酵素)からAKR5(たとえば5A1の酵素)の酵素は、図3の下部の楕円で囲んで示すように1つのブランチを作り、一方、主として微生物に存在するAKR6からAKR14までは図3の上部の楕円で囲んだように、他のブランチを作ることが知られていたが、この酵素は、これらとは異なる第三のブランチ(図3の右下の楕円)に属することがわかった。本酵素は、これ以外にAKRとして非常にユニークな性質を示す。その反応はアルデヒド基の酸化であり、生成物である4-ピリドキソラクトンの還元反応を全く触媒できない。また、2量体酵素であることや、NADP⁺ではなくNAD⁺を良好な補基質とする点でも珍しい。本酵素は、ピリドキサル以外に、L-フコースのようなD-threo-アルドースに対して高い活性を示した。後述するように、本酵素遺伝子と相同な遺伝子が根粒菌中に存在することがわかった。また、根粒菌中には、B₆分解経路に直接関わる別の4量体構造をしたピリドキサル4-デヒドロゲナーゼが存在していた。したがって、この2量体構造のピリドキサル4-デヒドロゲナーゼが

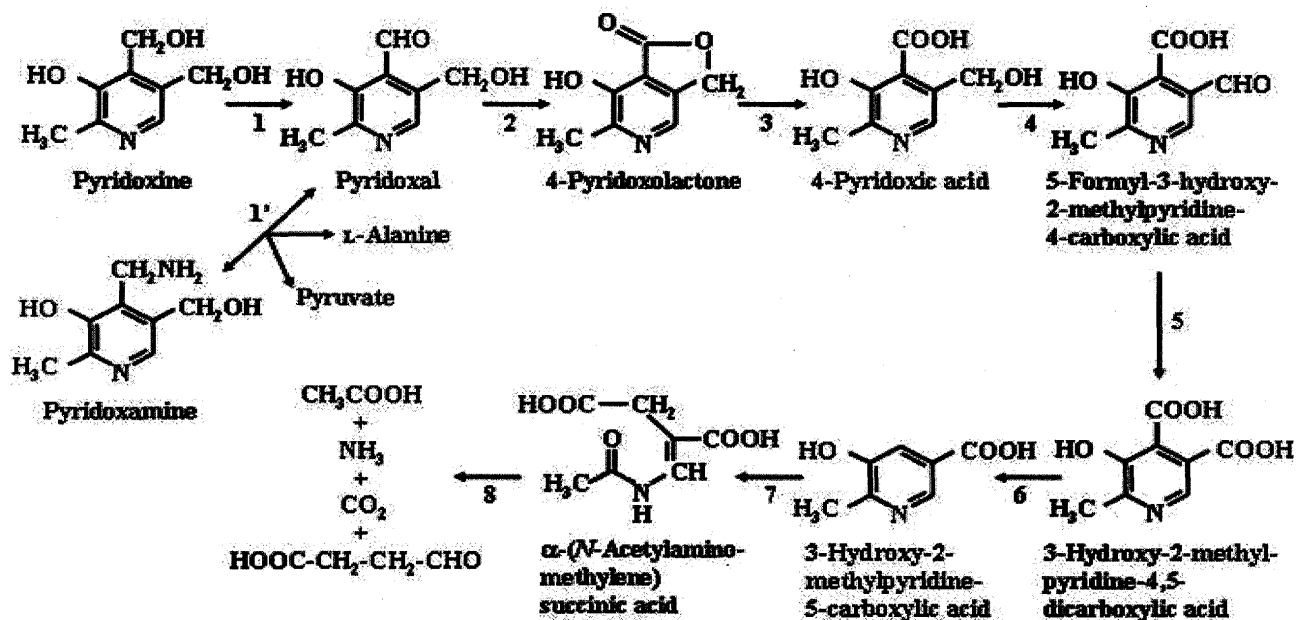


図4. ビタミン B₆ 分解経路Ⅰ

1: Pyridoxine 4-oxidase, 1': Pyridoxamine-pyruvate aminotransferase, 2: Pyridoxal 4-dehydrogenase, 3: 4-Pyridoxolactonase, 4: 4-Pyridoxic acid dehydrogenase, 5: 5-Formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine-4-carboxylic acid dehydrogenase, 6: 3-Hydroxy-2-methylpyridine-4,5-dicarboxylic acid decarboxylase, 7: 3-Hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylic acid dioxygenase, 8: α-(N-Acetylaminomethylene)succinic acid amidohydrolase

Ochrobactrum sp. 細胞内で、どの程度ピリドキサールの代謝に利用されているかは今後解明すべき問題である。

ピリドキシン 4-オキシダーゼについてはアミノ末端ペプチドと内部ペプチドの配列からプライマーをデザインし、PCR によって遺伝子を増幅し、さらにカセット法により、本酵素をコードする *pno* 遺伝子の全長をクローン化した¹⁶⁾。組換え酵素は野生株の酵素と同じ性質を示した。決定されたアミノ酸一次構造から、本酵素がグルコース-メタノール-コリン (GMC) オキシドレダクターゼファミリーに属することがわかった。ただ、今までに報告されている同ファミリーの酵素の中で、最もアミノ酸残基数が少なく、同ファミリーの認識配列のうち1つを欠いていた。本菌は4個のプラスミドを持っていることがわかった。そこで、*pno* 遺伝子の局在性を調べたところ、本遺伝子は、本菌のクロモソームに存在していることがわかった。また、本酵素とアミノ酸配列の相同性の高い酵素の分布を調べた。表4に示すように、66%とかなり高い相同性を示す機能未知タンパク質が根粒菌である *Mesorhizobium loti* のクロモソームに存在することがわかった。*M. loti* はゲノム解析されているので¹⁹⁾ このタンパク質をコードする遺伝子の周辺にある遺伝子の機能を検索したところ、興味深いことにこの遺伝子のごく近くに本分解経路の7番目の反応を触媒する酵素ときわめて高い相同性を有する酵素遺伝子が存在していることが明らかになった。根粒菌が本分解経路を有している可能性が高くなった。

そこで、まず初めに根粒菌に存在する66%の相同性を示す遺伝子がピリドキシン 4-オキシダーゼであるかどうかを調べた。この遺伝子 *mll6785* を *M. loti* からクローン

化し、大腸菌で大量発現系を構築した。組換え酵素を均一に精製して、性質を調べたところ、本酵素がピリドキシン 4-オキシダーゼであることがわかった²⁰⁾。さらに、本菌をピリドキシンを唯一の炭素・窒素源として培養したところ、増殖に時間がかかるもののピリドキシンを資化し増殖できた。このことは根粒菌が B₆ 分解経路を持ち、これら両遺伝子の周辺にその他の分解経路に関わる酵素の遺伝子が局在している可能性を示した。

PLP を補酵素として要求しないアミノ基転移酵素が本分解経路でピリドキサミンの分解のために利用される。この酵素の一次構造も一部分を除いてわかっていなかった。ただ、*Pseudomonas* MA-1 ではピリドキシン合成培地で増殖させると、この酵素の活性も増大することが報告されている。そこで、根粒菌をピリドキシンあるいはピリドキサミン合成培地で増殖させ、本酵素を部分精製し、アミノ末端アミノ酸配列を調べた。その配列は根粒菌の遺伝子 *mlr6806* のコードする酵素タンパク質のそれと一致した。さらに、*Pseudomonas* MA-1 由来の本酵素で報告された²¹⁾ 活性中心ペプチドの配列と同一の配列が *mlr6806* 遺伝子産物中に存在した。そこで、本遺伝子をクローン化し、組換え酵素を均一に精製し、性質を調べた。本組換え酵素はピリドキサミン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼであった²²⁾。本酵素は PLP を補酵素としなくてもかかわらず、その一次構造は PLP 依存性のアミノ基転移酵素と高い相同性(約30%)を示した。また、図5に示すように、活性中心リシン残基 (Lys197) の前後の推定二次構造の配置がフォールドタイプ1のクラスVのアミノ基転移酵素と同じであった。また、本酵素は逆反応の基質であるピリドキサールが活性中心リシン残基と

表4. *Ochrobactrum* sp. のピリドキシン 4-オキシダーゼに相同な酵素

酵素源	酵素名	アクセス番号	残基数	同一性(%)
<i>Mesorhizobium loti</i>	Unknown	AP003010	523	66
<i>E. coli</i>	Choline dehydrogenase	M77738	556	33
<i>Sphingomonas macrogolutabidus</i>	Polyethylene glycol dehydrogenase	AJ277295	533	31
<i>Pseudomonas</i> sp.	4-Nitrobenzyl alcohol dehydrogenase	AF043544	532	31
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Choline dehydrogenase	AF009415	560	34
<i>Pseudomonas putida</i>	Alcohol dehydrogenase	AJ246436	558	34
<i>Staphylococcus aureus</i>	Choline dehydrogenase	AP003137	569	32
<i>Aspergillus niger</i>	Glucose oxidase	A35459	605	28

シッフ塩基を作ることにもわかった。さらに、このリシン残基をロイシンに変異させると、活性は全く失われた。したがって、本酵素によるアミノ基転移反応は基本的に PLP 依存性アミノ基転移酵素と同じであり、活性中心リシン残基によるプロトンの受け渡しが重要な過程になっていると思われた。最近、本酵素の三次構造を明らかにすることができたので、本酵素が PLP を結合できない理由や生成物であるピリドキサルを解離しやすい理由等が立体構造とその周辺にあるアミノ酸残基の配置によって説明できることがわかった³⁶⁾。

これらの結果に基づき、その他の B₆ 分解経路の酵素遺伝子をすべて同定することにした。そのため、すでに報告されている分解酵素群の分子量とこの周辺にある遺伝子がコードする酵素タンパク質の分子量を比較し、さらにアミノ酸配列から予想される機能に基づき、各遺伝子がコードしている分解酵素の種類を予測した。そして、全ての遺伝子について発現系を構築し、組換え酵素の活性を測定した。なお、各酵素の基質は市販されていないため、ピリドキシン合成培地で培養して得られる培養液から精製するか、各々の分解酵素を大量発現した菌体を用いて調製した。

このやり方で最初に同定できたのは 3 番目の反応を触媒する酵素 4-ピリドキソラクトナーゼであった²³⁾。mlr6805 遺伝子が本酵素をコードしていた。ただし、この

酵素の場合にはこの酵素の遺伝子を予測するために、*Ochrobactrum* sp. では無く、新たなピリドキシン資化菌をスクリーニングし、本酵素を部分精製し、そのアミノ末端アミノ酸配列を決定した。その配列と mlr6805 遺伝子のコードする酵素タンパク質の相当するアミノ末端アミノ酸配列が 83% の相同性を示すことを確かめた。

次いで、本経路の全ての酵素を同定することができた²⁴⁾。図 6 に示すように分解経路の遺伝子群は、その他数種の機能未知遺伝子と共にクラスターを形成して根粒菌のクロモソーム遺伝子に存在していた。4 番目の反応を触媒する 4-ピリドキシン酸デヒドロゲナーゼは、mlr6792 が、5 番目の 5-Formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine-4-carboxylic acid (FHMPC) デヒドロゲナーゼは mlr6793、6 番目の 3-Hydroxy-2-methylpyridine-4,5-dicarboxylic acid (HMPDC) デカルボキシラーゼは mlr6791、7 番目の 3-Hydroxy-2-methylpyridine-5-carboxylic acid (HMPC) ジオキシゲナーゼは mlr6788、最後の 8 番目の酵素は mlr6787 の各遺伝子がコードしていた。これらの結果は学会発表した。このクラスターの中にある機能未知の遺伝子の同定と、分解経路遺伝子群の発現調節機構の解明が求められている。

B₆ 分解経路が根粒菌中に存在していることは非常に興味深い。本菌は、ミヤコグサと共生してその成長を支えている。本菌が B₆ を資化して増殖することは、天然の状態では可能性が低いと思われる。では、何故本分解経路

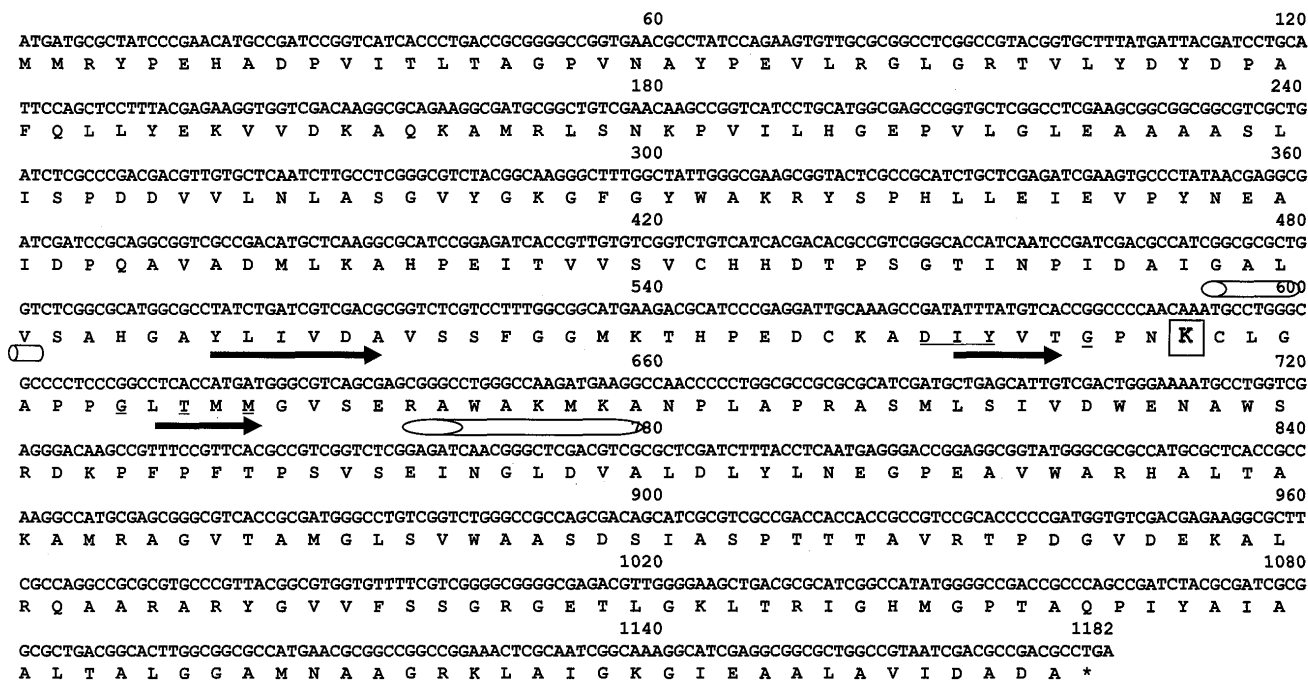


図 5. ピリドキサミン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼの一次構造と推定部分二次構造

活性中心リシン残基 (Lys197) は四角で囲んである。またその周辺にある PLP 依存性アミノ基転移酵素の保存アミノ酸残基を下線で示している。また、活性中心リシン残基の周辺にあるフォールドタイプ 1 のクラス V のアミノ基転移酵素に特徴的な二次構造 (推定) の内、シリンダーで α ヘリックスを、太い矢印で β 構造を示している。

が根粒菌中にあるのだろうか。そこで、まず根粒の形成にこの分解経路が必要であるかどうかを調べた。本経路で最も重要なピリジン環の分解を触媒する酵素 HMPC ジオキシゲナーゼ遺伝子を、破壊した根粒菌変異株を作製し、根粒の形成に対する効果を調べた²⁵⁾。表5に示すように、本酵素遺伝子の欠損は根粒形成数に影響を及ぼさなかった。また、本分解経路の初発の反応を触媒するピリドキシン4-オキシダーゼ遺伝子を破壊した株で同様の実験を行ったところ、本遺伝子の破壊によって根粒の形成数に変化が生ずることは無かった。これらの結果は、本分解経路は根粒の形成段階では必要とされないことを強く示唆している。ミヤコグサと本菌が共生関係に入り、植物体が成長する各段階で、本分解経路の酵素群がいかなる発現をするかを調べることで、本分解経路の役割に関する手がかりがえられると思われる。また、それらの結果から B₆ の新たな機能が浮かび上がるかもしれない。

5. B₆ 分解酵素群の応用

持続可能な社会を目指して化石燃料を大量消費し、地球環境を悪化させる従来の工業技術に変わる、より環境に優しく、エネルギー効率と生成収率の高い技術が求められている。酵素あるいは酵素を多量に含有する微生物

菌体を用いるバイオ技術はこの目的にかなう方法であり、今後さまざまな分野で利用されていくものと思われる。上述した B₆ 代謝酵素を大量発現させた大腸菌を利用すると、ファインケミカルとして有用な B₆ あるいはその誘導体のバイオ生産が可能となる。そのうちのひとつについて以下解説する。

4-ピリドキソラクトンは B₆ 関連化合物であり、紫外線吸収作用、抗貧血作用、キレート作用を有し、化粧品、医薬品原料として広範な利用が期待されるファインケミカルである²⁶⁾。現在、本化合物は重金属、有機溶媒、強酸・強アルカリ性無機物を用いる有機化学合成法だけが知られており、大量に製造するためには環境に多大の負担をかけることになる²⁷⁾。一方、もし本化合物を酵素あるいは微生物を利用してバイオ生産することができれば、これら有害な物質を用いる必要はなく、エネルギー的にもより生産効率が高くなり、大量製造には非常に有利である。本化合物をバイオ生産するためのひとつの方法として、ピリドキシン4-オキシダーゼとピリドキサル4-デヒドロゲナーゼを用いる方法が可能である。すなわち、原材料として大量入手可能なピリドキシンを用い、これら二つの酵素を共役させることで、4-ピリドキソラクトンを生産できる。反応の原理を図7に示した。

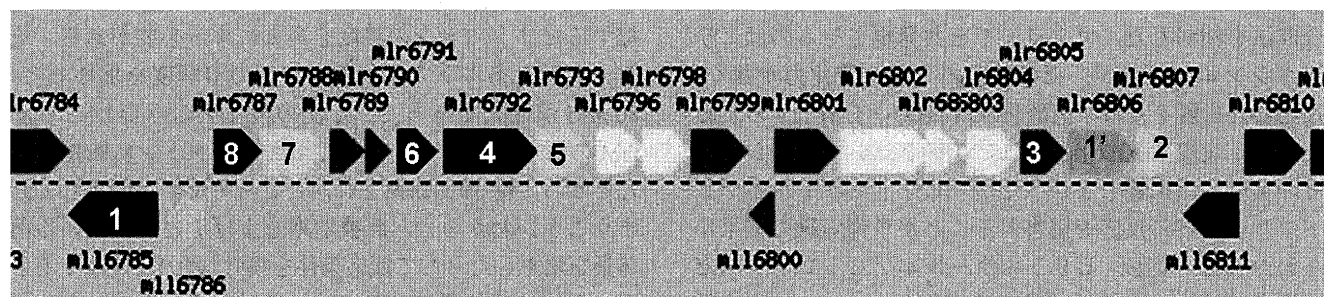


図6. 根粒菌 (*M. loti*) のクロモソーム中にあるビタミン B₆ 分解酵素のクラスター (RhizoBase に公開されている図を1部改変) RhizoBase に公開されている本菌の遺伝子群で、今回、明らかになったビタミン B₆ 分解酵素群をコードする遺伝子を示している。遺伝子に示した数字は、図4に示した酵素の番号に対応する。

表5. 根粒形成におよぼす HMPC ジオキシゲナーゼ遺伝子の影響

ミヤコグサ品種	<i>M. loti</i> 株	1植物根当たりの根粒数
Gifu B-129	野生株	4.2 ± 1.2 (n=30)
	遺伝子破壊株	4.0 ± 1.8 (n=30)
	相補株	4.2 ± 1.6 (n=30)
Miyakojima	野生株	3.7 ± 1.9 (n=10)
	遺伝子破壊株	3.9 ± 1.0 (n=10)

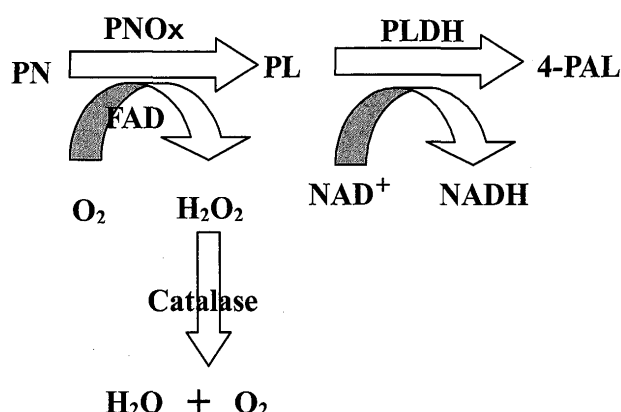


図7. 4-ピリドキソラクトンのバイオ合成法の原理

PNOx: Pyridoxine 4-oxidase, PLDH: Pyridoxal 4-dehydrogenase

実際には、活性酵素を大量に発現している大腸菌を用いる方法を開発した。そのために、1) ピリドキシン 4-オキシダーゼとカタラーゼを共発現させた形質転換大腸菌の作製とこの菌体を用いたピリドキシンからピリドキサルへのバイオ合成の検討、2) ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼを大量発現した形質転換大腸菌を用いるピリドキサルから 4-ピリドキソラクトンのバイオ合成法の検討、3) これら 2 種の形質転換大腸菌を組み合わせる直接にピリドキシンから 4-ピリドキソラクトンのバイオ合成法を検討した。カタラーゼを共発現させるのはピリドキシン 4-オキシダーゼの反応で生ずる酸化力が強く、反応に悪影響を及ぼす過酸化水素 (H₂O₂) を消去するためである。実際、過酸化水素はピリドキシン 4-オキシダーゼの反応には影響しなかったが、ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼの反応を阻害することが予備実験の結果からわかった。なお、ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼの反応では NADH が生成するのでこれを NAD⁺ に戻す系が必要であると思われたが、実際には予備実験の結果、大腸菌に備わった反応系で NAD⁺ の再生はおこなわれることがわかった。

カタラーゼ発現プラスミド pET21a-*katG* を作製し、ついで、ピリドキシン 4-オキシダーゼ遺伝子 *pno* を pET21a-*katG* へ連結した。このカタラーゼ遺伝子とピリドキシン 4-オキシダーゼ遺伝子を連結して挿入した発現プラスミドを pET21a-*katG-pno* とした。シャペロニンタンパク質遺伝子を挿入されたプラスミドであらかじめ形質転換された *E. coli* BL21(DE3)/pKY206 にこの連結プラスミドを導入し、形質転換株 BL21(DE3)/pET21a-*katG-pno*/pKY206 を得た。なお、シャペロニンタンパク質は発現酵素タンパク質が不溶化してインクルージョンボディとなるのを防ぐ作用があり、ピリドキシン 4-オキシダーゼの発現には必須である。このカタラーゼ/ピリドキシン 4-オキシダーゼ/シャペロニン共発現株を 10 mM ピリド

キシンを含む反応溶液 (pH 7.5, 1 mL) 中に懸濁し、30℃で振とうしながら反応を行った。120 分間の反応でピリドキシンは 100% ピリドキサルへと変換された。

ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*pdh*) を挿入した発現ベクター pET21a-*pdh* で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)/pET21a-*pdh* はピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼを大量発現した。この形質転換大腸菌を用いて 10 mM ピリドキサルを 4-ピリドキソラクトンに変換したところ、約 50% が 4-ピリドキソラクトンに転換されたが、残りの約 50% はピリドキシンへ転換された。理由は、本酵素がピリドキサルを酸化して 4-ピリドキソラクトンを生ずる反応とそれを還元してピリドキシンを生成する反応を触媒したためであった。したがって、本酵素を使って 4-ピリドキソラクトンを作るためには、副生成されるピリドキシンをピリドキサルに酸化するために、ピリドキシン 4-オキシダーゼとの共役反応が必須であることがわかった。

そこで、カタラーゼ/ピリドキシン 4-オキシダーゼ/シャペロニン共発現株とピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ発現株をピリドキシン 4-オキシダーゼとピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼの総活性が等しくなるように添加し、10 mM のピリドキシンを用いて反応をおこなった結果、120 分間の反応で、100% の収率で 4-ピリドキソラクトンが生成した。

バイオ合成反応の効率を最大限に上げるためには、添加するピリドキシンの濃度を最大にする必要がある。そこで、反応条件下でピリドキシンの溶解度を求めると、80 mM が最大であった。上記の菌体を組み合わせる 80 mM のピリドキシンを 4-ピリドキソラクトンに転換させたところ、約 30% 転換されたところで反応が飽和してしまうことがわかった。転換効率を上げるために用いる菌体量を増やしたりして反応条件を検討したが、困難であった。そこで補基質である NAD⁺ を反応液に添加したところ、添加濃度依存的に転換効率を上昇させた。最終的に 0.5 mM の NAD⁺ を添加して反応させることにより、80 mM のピリドキシンは 100% 4-ピリドキソラクトンに転換された。また、反応が進行するにつれて 4-ピリドキソラクトンが結晶として析出した。従来、重金属触媒と有機溶媒を用いて数段階の反応を行っても低収率でしかおこなえなかった反応を常温常圧における一段階の反応で 100% の収量でおこなうことができた。

もう一つの分解酵素群の応用法として B₆ の分別定量法を考案した。食品中には、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンならびにそれらのリン酸エステルの計 6 種類の B₆ 化合物が含まれている。また、これら以外に植物食品中には配糖体であるピリドキシン-β-グルコシドが存在するが、これは B₆ の貯蔵型であるとされ、B₆ とはされない。しかし、食品成分表に記載されている B₆ 含有量の中にはこの貯蔵型も含まれている。この貯蔵型 B₆ 化合

物の栄養価については一定の評価が得られておらず、可能であればこの貯蔵型 B₆ 化合物は分別定量されるのが望ましい。また、最近、栄養機能としては等価であるとされる天然型 B₆ 化合物の各々が特有の生理機能を示すことが明らかにされている。特に、ピリドキサミンは抗活性カルボニル作用を示し、糖尿病合併症の予防・治療効果を有することが分かった²⁸⁾。したがって、食品中のピリドキサミンとピリドキサミン 5'-リン酸含有量を把握することは、さまざまな分野で有益であると思われる。

B₆ 分別定量法として、現在最も汎用されているのは蛍光検出 HPLC 法である。イオン交換カラムを用いる方法²⁹⁾と逆相カラムを用いる方法³⁰⁾⁻³³⁾がある。共にヒト血漿中の PLP とピリドキサールの定量や比較的 B₆ 含有量の高い実験試料の分析のために有効に用いられている。しかしながら、両方法とも食品、特に植物性食品中の分別定量に用いることは不可能である。試料中の B₆ 化合物の含有量が低いことと蛍光性夾雑物の種類と含有量が高いためである。したがって、40 年以上に亘って、食品中の B₆ 含有量はマイクロバイオアッセイ法によって総量として測定されている。

今回、発表した方法(酵素-HPLC 法)³⁴⁾の原理は、全ての B₆ 化合物を塩酸加水分解と酵素反応により 4-ピリドキソラクトンに変換し、定量するものである。原理を図 8 に示した。4-ピリドキソラクトンは非常に強い蛍光を示す化合物であるため、蛍光 HPLC の条件を新たに設定することで、ポストカラム液を使用しないで 0.5 pmol までを精度良く定量できた。標準 B₆ 化合物と食品試料を AOAC 法が採用しているオートクレーブを用いる塩酸加水分解処理に供した。食品の種類に応じて塩酸濃度とオートクレーブの時間が異なる 3 種類の処理条件で標準 B₆ 化合物を単独あるいは組み合わせた溶液を調製し、オートクレーブ処理あるいは未処理(塩酸と混合した後、水中に保存)の試料を調製した。これらの試料の pH を 7.0 に調整し、適当に希釈して、酵素反応に供した。ピリドキサールはピリドキサール 4-デヒドロゲナーゼで 4-ピリドキソラクトンに転換した。PLP はオートクレーブ処理によりピリドキサールに加水分解されるので、オートクレーブ処理した試料の測定値からオートクレーブ未処理の試料の測定値を引き算することで算出できた。このやり方で、ピリドキサールとピリドキサール 5'-リン酸の標準直線を

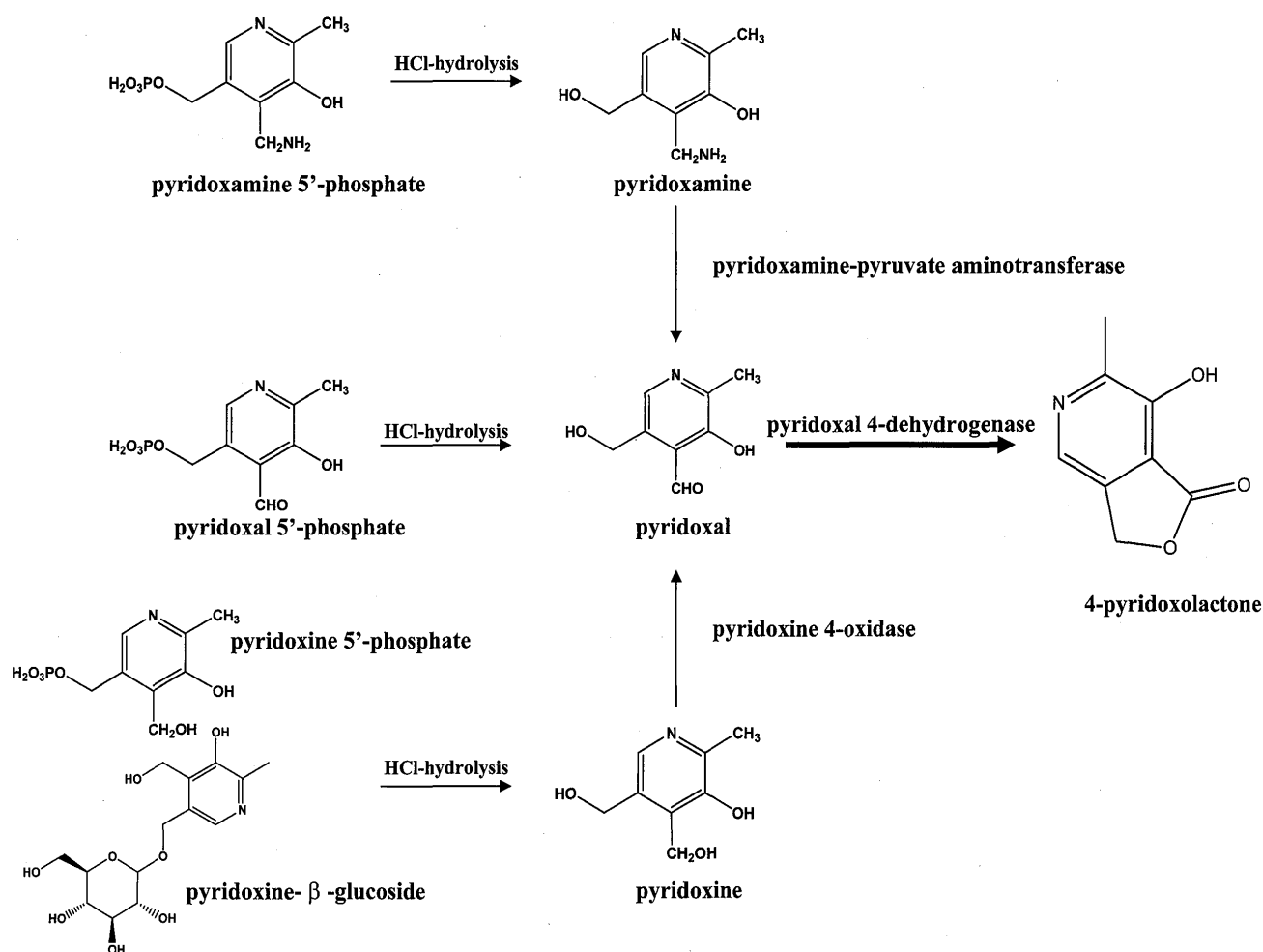


図 8. ビタミン B₆ 分別定量法の原理

求めた。同様に、ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼに加えてピリドキサミン-ピルビン酸アミノ基転移酵素を添加した反応液を用い、ピリドキサミンとピリドキサミン 5'-リン酸の標準直線を求めた。ピリドキシン、ピリドキシン 5'-リン酸ならびにピリドキシン配糖体についてはピリドキシン 4-オキシダーゼとピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼを添加した反応液を用いて定量できた。今回の条件ではピリドキシン 5'-リン酸とピリドキシン配糖体は合計量として測定される。なお、ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼの反応は 4-ピリドキソラクトンからピリドキサルへの逆反応は触媒しないため、 NAD^+ が十分量存在すると B_6 化合物は完全に 4-PAL へと転換された。

本方法により、標準 B_6 化合物の各々は 0.5 pmol まで、分別定量することができた。また、AOAC 法が採用しているリン酸エステル型 B_6 化合物を加水分解して、遊離型に転換するための反応条件が以前報告されている³⁵⁾ように、不十分であることが確認できた。一方、穀類、豆類、種実類、野菜類、藻類、ならびに肉類計 6 群のなかの 16 種類の食品中の B_6 含有量を測定したところ、分析値は得られたが、食品によっては、内部標準法で求めた各 B_6 の回収率が非常に低いものがあり、食品の処理条件にさらに改良を加える必要があることがわかったため、今回は分析値を示していない。なお、報告した論文³⁴⁾中に、鶏ささ身、にんにく、唐辛子の分析データを示している。長時間の塩酸加水分解処理をする代わりに、ホスファターゼやグルコシダーゼを用いて、リン酸エステル型 B_6 からリン酸をはずし、また、グルコシドからグルコースを取り除く必要があると思われる。したがって、確定的ではないものの、従来、植物性食品中の B_6 の大部分はピリドキシン- β -グルコシドであると考えられてきたが、植物性食品の種類によっては動物性食品と同等あるいはそれ以上の天然型 B_6 を含有することが示唆された。今後、この結果を確かなものにする必要がある。また、酵素処理の過程を簡便化するようにキットを開発し、本方法を広めていく必要がある。

6. おわりに

B_6 の発見から 73 年が過ぎた。本ビタミンに関する研究は、当初、本ビタミンの構造に関する研究と本ビタミン自体が触媒する各種反応、特に、各種アミノ酸のラセミ化反応、脱炭酸反応、アミノ基転移反応の機構について行われた。ついで、PLP が脱炭酸酵素やアミノ基転移酵素の補酵素であることがわかり、研究の中心はこれら PLP 依存性酵素の構造と反応機構の解明に移った。これらの研究は、補酵素である PLP が、単独では効率と反応特異性が悪いものの触媒できる各種の反応が、アポ酵素タンパク質と結合することではかたに触媒効率が増し、さらに反応特異性が厳密になるという現象を科学的に解明することであり B_6 依存性酵素だけでなく、酵素全般の

触媒機構を考える上で貴重な数多くの知見を与えた。また、 B_6 依存性酵素の欠損あるいは活性低下によって引き起こされる疾患に関する研究も進展した。これらの目覚ましい研究成果によって、ともすれば B_6 は B_6 依存性酵素の機能を維持するのが主たる役目であると思われてきた感があった。もちろん、これは本ビタミンの栄養機能の基礎となるものであり、その重要性は揺るぐものではない。しかしながら、最近になって、 B_6 単独で、補酵素としての機能に依存しない、様々な機能を示すことが明らかとなってきている。そして、これらの機能に基づき、 B_6 化合物を医薬品として利用する機運が生じている。これら新規機能に関しては、6 種類の B_6 化合物は、各々、異なった効果を示す。したがって、今後、 B_6 に関する研究は、個々の B_6 化合物に焦点を絞ったものになるだろう。その上で、さらに未知の新規機能の発見があることを期待したい。

謝 辞

本研究は、愛媛大学大学院連合農学研究科博士の学位を修得された金田安生、Ruamsab Chumnantana, Trongpanich Yanee, 森田友岳、横地奈葉の各博士および同研究科に在学中の皆さん、ならびに高知大学農学部生物資源科学科応用生物化学分野の修士修了生ならびに学部卒業生の皆さんのご協力のもとで行われた研究であり、皆様に厚く感謝の意を表します。また、ビタミン B_6 分解酵素の研究全般についてご協力いただいた、高知大学総合研究センター大西浩平教授に厚くお礼申し上げます。また、ピリドキサルレダクターゼの研究に関して協力いただきました大阪大学理学研究科倉光成紀教授および増井良治准教授、ならびに香川大学農学部竹川薫教授、高知大学農学部芦内誠准教授にお礼申し上げます。また、酵素の立体構造解析にご協力いただいた京都大学農学研究科三上文三教授ならびにその研究室の研究者の方々にお礼申し上げます。さらに、ピリドキサミン-ピルビン酸アミノ基転移酵素の研究にご協力いただいた大阪医科大学医学部林秀行教授にお礼申し上げます。なお、本研究の一部は、科学研究費補助金、タンパク 3000 プロジェクトなどの研究資金を基に行われた。

(平成 19.8.17 受付)

文 献

- 1) John RA (1995) Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1248**, 81-96
- 2) Maksymowych AB, Daniel V, Litwack G (1990) Pyridoxal phosphate as a regulator of the glucocorticoid receptor. *Ann N Y Acad Sc* **585**, 438-451
- 3) Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B_6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9374-9378
- 4) Matsubara K, Komatsu S, Oka T, Kato N (2003) Vitamin B_6 -mediated suppression of colon tumorigenesis, cell proliferation, and angiogenesis. *J Nutr Biochem* **14**, 246-250

- 5) Voziyan PA, Hudson BG (2005) Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* **1043**, 807-816
- 6) Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF (2000) Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* **71**, 129-134
- 7) Chumnantana R, Yokochi N, Yagi T (2005) Vitamin B₆ compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. *Biochim Biophys Acta* **1722**, 84-91
- 8) Yokochi N, Morita T, Yagi T (2003) Inhibition of diphenolase activity of tyrosinase by vitamin B(6) compounds. *J Agric Food Chem* **51**, 2733-2736
- 9) Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP (2005) Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* **127**, 3682-3683
- 10) Nakano M, Morita T, Yamamoto T, Sano H, Ashiuchi M, Masui R, Kuramitsu S, Yagi T (1999) Purification, molecular cloning, and catalytic activity of *Schizosaccharomyces pombe* pyridoxal reductase. A possible additional family in the aldo-keto reductase superfamily. *J Biol Chem* **274**, 23185-23190
- 11) Morita T, Takegawa K, Yagi T (2004) Disruption of the *plr1*⁺ gene encoding pyridoxal reductase of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem (Tokyo)* **135**, 225-230
- 12) Yagi T, Tanouchi A, Hiraoka Y (1998) Growth phase-dependent active transport of pyridoxine in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 145-150
- 13) Stolz J, Wöhrmann HJP, Vogl C (2005) Amiloride uptake and toxicity in fission yeast are caused by the pyridoxine transporter encoded by *bsu1*⁺(*car1*⁺). *Eukaryotic cell* **4**, 319-326
- 14) Hirose K, Chumnantana R, Nakashima T, Ashiuchi M, Yagi T (2000) Efflux system for pyridoxine in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2675-2679
- 15) Yagi T, Kishore GM, Snell EE (1983) The bacterial oxidation of vitamin B₆. 4-Pyridoxic acid dehydrogenase: a membrane-bound enzyme from *Pseudomonas* MA-1. *J Biol Chem* **258**, 9419-9425
- 16) Kaneda Y, Ohnishi K, Yagi T (2002) Purification, molecular cloning, and characterization of pyridoxine 4-oxidase from *Microbacterium luteolum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1022-1031
- 17) Trongpanich Y, Abe K, Kaneda Y, Morita T, Yagi T (2002) Purification and characterization of pyridoxal 4-dehydrogenase from *Aureobacterium luteolum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 543-548
- 18) Yokochi N, Yoshikane Y, Trongpanich Y, Ohnishi K, Yagi T (2004) Molecular cloning, expression, and properties of an unusual aldo-keto reductase family enzyme, pyridoxal 4-dehydrogenase, that catalyzes irreversible oxidation of pyridoxal. *J Biol Chem* **279**, 37377-37384
- 19) Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331-338
- 20) Yuan B, Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, Yagi T (2004) The nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* has and expresses the gene encoding pyridoxine 4-oxidase involved in the degradation of vitamin B₆. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 225-230
- 21) Hodsdon J, Kolb H, Snell EE, Cole RD (1978) The pyridoxal-binding site in pyridoxamine-pyruvate transaminase. *Biochem J* **169**, 429-432
- 22) Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, Hayashi H, Yagi T (2006) Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase. *Biochem J* **396**, 499-507
- 23) Funami J, Yoshikane Y, Kobayashi H, Yokochi N, Yuan B, Iwasaki K, Ohnishi K, Yagi T (2005) 4-Pyridoxolactonase from a symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*: cloning, expression, and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1753**, 234-239
- 24) Yagi T, Yokochi N, Yoshikane Y, Yuan B, Funami J, Tadokoro M, Ge F. (2005) Genes encoding enzymes involved in degradation for vitamin B₆. Abstract of IUBMB Symposium 344, **L11R**, 30
- 25) Yuan B, Yokochi N, Yoshikane Y, Ohnishi K, Yagi T (2006) Molecular cloning, identification and characterization of 2-methyl-3-hydroxy-5-carboxylic-acid-dioxygenase-coding gene from the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *J Biosci Bioenz* **102**, 504-510
- 26) Scott ML, Norris LC, Heuser GF, Bruce WF (1945) Studies on organic factors required for prevention of anemia in chicks. *J Biol Chem* **158**, 291-298
- 27) Rao SPS, Manohar H, Aoki K, Yamazaki H, Bau R (1986) Novel oxidation of pyridoxal in ternary metal complexes. An X-ray study of the products. *J Chem Soc Chem Commun* **4**-6
- 28) Voziyan PA, Mets TO, Baynes JW, Hudson BG (2002) A post-amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J Biol Chem* **277**, 3397-3403
- 29) Mahuren JD, Coburn SP (1997) Determination of 5-pyridoxic acid, 5-pyridoxic acid lactone, and other vitamin B₆ compounds by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **280**, 22-29
- 30) Edwards P, Liu PK, Rose GA (1989) A simple liquid-chromatographic method for measuring vitamin B₆ compounds in plasma. *Clin Chem* **35**, 241-245
- 31) Gregory JF, Sartain DB (1991) Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B₆ in foods. *J Agric Food Chem* **39**, 899-905
- 32) Tsuge H (1997) Determination of vitamin B₆ vitamers and metabolite in a biological sample. *Methods Enzymol* **280**, 3-12
- 33) Bisp MR, Bor MV, Heinsvig EM, Kall MA, Nexø E (2002) Determination of vitamin B₆ vitamers and pyridoxic acid in plasma: development and evaluation of a high-performance liquid chromatographic assay. *Anal Biochem* **305**, 82-89
- 34) Nishimura S, Nagano S, Crai CA, Yokochi N, Yoshikane Y, Ge F, Yagi T (2008) Determination of individual vitamin B₆ compounds based on enzymatic conversion to 4-pyridoxolactone. *J Nutr Sci Vitaminol* **54**, 18-24
- 35) 柘植治人, 西村直子, 前野元秀, 早川 享志 (1995) 微生物法による食品中の総ビタミン B₆ 量定量のための酸加水分解条件の検討 ビタミン **69**, 686-696
- 36) Yoshikane Y, Yokochi N, Yamasaki M, Mizutani K, Ohnishi K, Mikami B, Hayashi H, Yagi T. (2008) Crystal Structure of Pyridoxamine-Pyruvate Aminotransferase from *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *J Biol Chem* **283**, 1120-1127