

Vanadium Haloperoxidase의 구조와 작용 메커니즘과 해양천연물질

한재홍*

중앙대학교 생명공학과, 금속효소 연구그룹, 생명환경 연구원

Reaction Mechanism of Vanadium Haloperoxidase and Marine Natural Products

Jaehong Han*

*Metalloenzyme Research Group, BET Research Institute and Department of Biotechnology,
Chung-Ang University, Anseong, 456-789 Korea*

초 록

다양한 생리활성을 가지는 marine natural products는 일반적인 secondary metabolites와 유사한 구조를 가지는데, 염소, 브롬, 요오드의 할로겐 원소에 의해 수식이 되어있는 것이 일반적이다. Vanadium haloperoxidase는 이러한 marine natural products의 생산에 중요한 효소로 vanadate를 조효소로 하는 금속효소이다. 본 리뷰에서는 vanadium haloperoxidase의 분리와 단백질 구조를 살펴보고, 이 금속효소의 작용기작에 대해서 설명할 것이다. 마지막으로, vanadium haloperoxidase의 반응성과 secondary metabolites 중 indole, terpenoids, acetogenins의 생합성 예를 살펴볼 것이다.

Abstract

Marine natural products with various bioactivities are featured with similar structure to the common secondary metabolites and generally modified by halogenides, such as chloride, bromide, and iodide ions. Vanadium haloperoxidase is a key enzyme for the production of marine natural products and a metalloenzyme which requires a cofactor of vanadate. This review will cover isolation of vanadium haloperoxidase and the protein structures, as well as reaction mechanism of the metalloenzyme. Finally, reactivity of vanadium haloperoxidase and the biosynthesis of the secondary metabolites of indole, terpenoids, and acetogenins will be described.

현재 그 구조가 보고된 단백질은 약 60% 정도가 금속이온을 포함하고 있으며, 이들 금속효소는 단백질의 작용에 직간접적으로 중요한 역할을 하고 있다.¹⁾ 산소 분자를 전달하는 산화효소에는 hemoglobin이나 hemerythrin과 같은 산소분자의 전달에 작용하는 단백질이 있으며, 이들은 산화환원의 촉매적 작용을 동반하지 않는다. 반면에 cytochrome P-450나 methane monooxygenase, catechol dioxygenase와 같은 효소는 산소분자를 활성화하여 산소 원자를 기질에 전달하는 산화효소의 촉매적 특성을 가진다. 이외에 산소분자의

환원된 유도체인 superoxide anion과 hydrogen peroxide를 다루는 효소로는 Cu-Zn superoxide dismutase, catalase, peroxidase 등이 있다(Table 1).

Peroxidase와 catalase는 환원된 산소분자인 organic peroxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 물과 산소를 형성하는데, Table 2에서 보는 바와 같이 haloperoxidase는 horseradish peroxidase와 반응이 유사하나, 기질인 hydrogen peroxide 외에 halide를 사용하는 것이 특징적이다. 또한, 조효소의 구조적 측면에서 horseradish peroxidase나 spinach peroxidase는 철이온을 포함하는 heme을 가지는데,

Table 1. 산소 분자와 작용하는 금속 효소들²⁾

효소 이름	기질	반응	작용 금속	금속 배위 리간드
Hemoglobin, Myoglobin	산소분자	산소 분자 전달	Fe(II)	Porphyrin
Hemerythrin	산소분자	산소 분자 전달	Fe(II)	Protein side chain
Hemocyanin	산소분자	산소 분자 전달	Cu(I)	Protein side chain
Cytochrome P-450	산소분자	산소 원자 전달 hydroxylation, epoxidation, dealkylation, deamination, S-oxidation, dehalogenation	Fe(II), Fe(III), Fe(IV), Fe(V)*	Porphyrin
Methane monooxygenase	산소분자	Methane hydroxylation	Fe(II), Fe(III), Fe(IV)*, Fe(V)*	Protein side chain
Catechol and other dioxygenases	산소분자	Aromatic ring cleavage	Fe(III), Fe(IV)*, Fe(V)*	Protein side chain
Molybdenum oxotransferases	물, nitrate, formate, DMSO, 등	Xanthine oxidation, sulfite oxidation, nitrate oxidation, formate dehydrogenation, CO dehydrogenation, DMSO reduction, 등	Mo(IV), Mo(V), Mo(VI)	Pterin
Superoxide dismutase	Superoxide ion	Dismutation of superoxide ion into hydrogen peroxide and water	Cu(II)-Zn(II), Fe, Mn	Protein side chain
Peroxidase and catalase	Hydrogen peroxide	물의 형성과 기질의 변환, 산소의 형성	Fe, V, Mn	Porphyrin, protein side chain

* 활성종으로 제안된 금속 이온의 산화상태

Table 2. Peroxidase와 catalase의 촉매반응

효소	반응
Cytochrome c peroxidase	$ROOH + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$
Horseradish and spinach peroxidase	$A-H_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$
Haloperoxidase	$A-H + X^- + H^+ + H_2O_2 \rightarrow A-X + 2H_2O$
Catalase	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

haloperoxidase는 heme 뿐만 아니라, vanadium의 산화물인 vanadate(VO_4^{3-})를 가지는 종이 있다.

Haloperoxidase에는 heme haloperoxidase와 vanadium haloperoxidase(VPO) 뿐만 아니라, 금속 이온을 포함하지 않는 metal free haloperoxidase도 있다.³⁾ 또한 peroxidase는 아니지만, 유기조효소를 가지는 FAD-dependent halogenase도 최근에 보고되었다.⁴⁾

본 보고서에서는 haloperoxidase의 일종인, heme을 조효소로 가지지 않는, vanadium haloperoxidase의 특성과 작용을 살펴보고자 한다. Vanadium haloperoxidase는 aromatic 화합물의 산화적 halogenation

을 촉매할 뿐 아니라, 입체선택적인 sulfoxidation을 매개하여 산업적으로도 매우 중요한 효소이다. 또한 VBPO는 해양 식물에서 가장 흔한 haloperoxidase로 hydrogen peroxide를 이용하여 다양한 기질을 bromination 시켜 여러가지 유용한 marine natural products를 형성한다. VPO는 brown microalgae인 *Ascophyllum nodosum*에서 최초로 확인되었다.⁵⁾ Vanadium haloperoxidase에는 사용되는 halogenides에 따라 vanadium chloroperoxidase (VCPO), vanadium bromoperoxidase(VBPO), vanadium iodoperoxidase(VIPO)가 있다. Fluoride는 electronegativity가 매우 커서 산화되기 제일 어려

Table 3. Vanadium haloperoxidase의 출처

Vanadium haloperoxidase	Source	Reference
VCPO	Fungus <i>Curvularia inaequalis</i>	9, 19
VBPO	Brown alga <i>Ascophyllum nodosum</i>	5, 10
VBPO	Red alga <i>Ochtodes secundiramea</i>	11
VBPO	Red alga <i>Corallina pilulifera</i>	12
VBPO	Red alga <i>Corallina officinalis</i>	13
VIPO	Laminariaceae <i>Laminaria saccharina</i>	14

은 halogenide인데, 아직까지 vanadium fluoroperoxidase는 보고되지 않았다. Table 3에서는 현재 보고된 VPO의 출처를 보여주고 있다. VBPO는 다양한 해초에서 발견되었으며, 일부는 이끼류와 곰팡이에서도 발견되었다. 해초에서는 VBPO가 주로 세포막의 외부에서 발견되고 있어서 reproductive cycle에서 세포가 zygotes를 부착하기 위해 polyphenols을 고분자화하는 것이 생물학적 기능일 것으로 생각되고 있다. Red marine alga인 *Corallina pilulifera*에서는 allelochemical로 bromoform(CBrH_3)의 형성이 관찰되었으며, hydrogen peroxide의 제거에도 VBPO가 관여함이 보고되었다.⁶⁾ 이끼류나 곰팡이 류에서는 방어적 작용으로 사용되는 것으로 추측되나 그 생물학적 기능이 아직 불분명하다. VCPO는 곰팡이 류에서만 발견되었으며, VBPO와 VIPO는 다양한 해초류에서 발견되고 있다.

VPO는 subunit 당 하나의 vanadate를 필요로 하며, vanadate에 있는 vanadium 이온은 +5의 산화 상태를 가지고 있음이 EPR과⁷⁾ K-edge X-ray absorption spectroscopy에⁸⁾ 의해서 밝혀졌다. 비록 산화환원 활성을 가지는 vanadate를 효소활성에 필요로 하지만, 촉매반응 동안에 vanadium의 산화 상태는 않는 것으로 생각되고 있다. 오히려 vanadium의 역할은 활성화된 peroxo intermediate를 형성하기 위해서 hydrogen peroxide를 결합하는 것으로 제안되었다. Peroxo intermediate는 bromide ion을 두 전자 산화시켜서 Br^+ 를 형성하는데, bromium cation은 즉시 활성자리에서 HOBr을 형성하는 것으로 믿어지며, 비효소적으로 기질을 산화하게 된다. 기질이 존재하지 않을 경우는 VPO가 hydrogen peroxide를 singlet oxygen을 형성하게 된다. VCPO나 VBPO에 의해 형성되는 HOCl이나

HOBr은 가장 강력한 산화제로 알려져 있다. 특히 VCPO가 더욱 강한 산화력을 가지고 있다.

1. Vanadium bromoperoxidase의 정제와 결정화¹⁵⁾

VBPO는 보통 추운 겨울에 효소의 함량이 높은 것으로 알려져 있는데, 수집한 해초를 Tris 버퍼에서 갈아서 원심분리를 한 후 단백질 분획을 모은다. 모은 단백질 분획은 ammonium sulfate를 사용하여 염석(salting-out)을 한 후 다시 원심분리를 하고, 분리된 침전물을 완충용액에 녹여서 이온교환 칼럼으로 정제한다. Affinity column chromatography를 거쳐 gel permeation chromatography로 최종 정제를 하면 순수한 분획이 분리되는데 분리과정 중 활성을 검증하기 위해서는 vanadate를 첨가해 주어야 한다. 분리된 순수한 단백질은 vanadium ion의 존재 하에서 ammonium phosphate나 KCl로부터 결정화할 수 있다.

2. Vanadium haloperoxidase의 구조와 활성 자리 및 반응기작

현재까지 3개의 vanadium-dependent haloperoxidase의 단백질 X-ray 구조가 보고되었으며, VBPO는 *A. nodosum*과 *C. officinalis*에서 분리되었으며 VCPO는 *C. inaequalis*에서 분리되어 결정화되었다. 이들 단백질은 매우 유사한 단백질 3차 구조를 가지며, vanadate의 결합 위치의 아미노산 잔기들은 conserved 되어있다. Vanadate는 four-helix structural motif의 중심에 결합하며 active site는 15~20 Å의 깊이를 가지는 cleft의 안쪽에 존재한다. 단백질의 표면은 매우 acidic하며, active

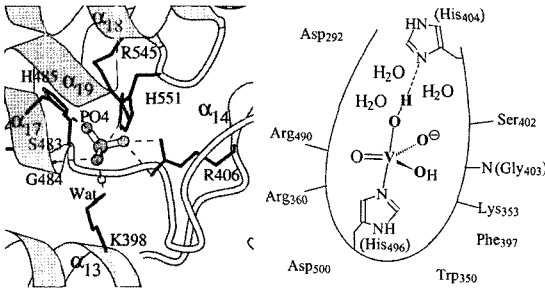


Fig. 1. VCPO의 단백질 X-ray 구조(왼쪽)와 VCPO active site의 schematic drawing(오른쪽).

site 주변의 cleft는 기질이 진입하는 통로로 주로 hydrophobic한 아미노산 잔기들이 존재한다. *C. officinalis*의 VBPO는 결정화 조건에서 vanadate 대신에 phosphate를 active site에 결합한 형태로 결정화되었는데, 이 VBPO의 phosphate form을 보면 inorganic phosphate가 active site cleft의 밑 쪽에 vanadate 대신 위치하며, vanadate에 수소결합을 할 것으로 생각되는 histidine 잔기가 phosphate의 산소원자에 수소결합하고 있다(Fig. 1).¹⁶⁾ Vanadate는 free한 상태에서는 tetrahedral geometry를 가지나, active site 내부에 있는 vanadate는 전형적인 trigonal bipyramidal 구조를 가지며, vanadium의 axial ligand로 OH와 ⁴⁹⁶His의 imidazole의 질소원자가 배위하며 이들은 집적적인 수소 결합을 하고 있다. OH axial ligand는 다른 ⁴⁰⁴His에 수소 결합하고 있으며, ⁴⁰⁴His을 alanine으로 치환하였을 경우 bromide를 산화하지 못하고, iodide만을 산화함이 보고되었다.¹⁷⁾ Chloride ion이 산화하기 제일 어렵고, bromide와 iodide ion의 순으로 산화되는 정도가 쉬우므로, site-directed mutagenesis에 의해서 산화력이 감소하였음을 알 수 있다. Vanadate의 3개의 equatorial 산소 원자는 두 개의 arginines, lysine, serine과 glycine amide backbone에 수소결합을 하고 있다. VBPO와 VCPO와의 구조는 VCPO의 ³⁹⁷Phe이 His으로 치환된 것을 제외하면, 거의 같으므로 Phe 아미노산 잔기가 효소의 산화력에 영향을 주는 것으로 보인다(Fig. 1). VCPO의 ³⁹⁷Phe을 VBPO와 같이 His으로 치환하면, bromination활성은 증가하나, 낮은 pH에서 효소 활성이 저해를 받는 것이 보고되었다. 그러므로, pH 변화에

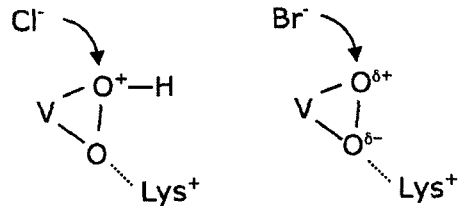


Fig. 2. VPO의 active site에 hydrogen peroxide가 결합한 후 형성되는 square pyramidal 구조 vanadate reactive species에서 형성될 것으로 제안된 두 가지 side-on bound peroxide의 구조 비교.

다른 효소 활성의 변화를 설명하기 위해서 Fig. 2와 같이 VCPO와 VBPO에는 두 가지 형태의 peroxide가 존재함이 제안되었다.¹⁸⁾ Fig. 2에서 왼쪽의 protonation된 hydroperoxide는 더 강한 산화력을 보이고, 오른쪽의 protonation되지 않은 peroxide는 비교적 약한 산화력을 보인다.

일반적으로 산화상태가 +5인 vanadium는 peroxo complex를 잘 형성하는 것으로 알려져 있는데, vanadium haloperoxidases의 peroxo forms을 X-ray 회절 분석과¹⁹⁾ ¹⁷O-NMR 측정을 통해서²⁰⁾ 분석한 결과 peroxide가 vanadium에 배위되어 있다는 것이 확인되었다. 또한, *A. nodosum* VBPO의 ¹⁷O-NMR 측정은 VCPO의 연구로부터 제안된 두 가지 peroxide에 대한 분광학적 증거를 제시한다. Fig. 3의 ¹⁷O-NMR spectrum 상에서 580 ppm 근처에 Fig. 2의 오른쪽의 peroxovanadium 종이 발견되고, 220 ppm과 250 ppm에서 Fig. 2의 왼쪽에 보이는 hydroperoxovanadium 종이 발견된다. 반면, vanadium-peroxo 활성 중간체가 형성되고 난 후 반

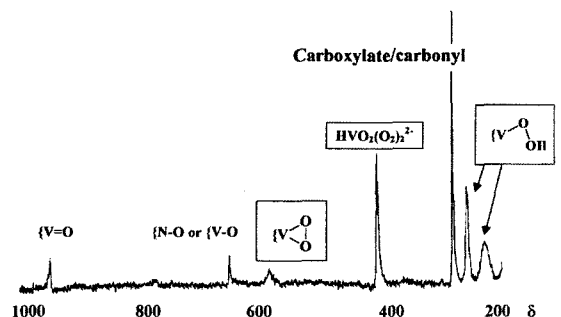


Fig. 3. *A. nodosum*에서 분리된 VBPO의 48.82 MHz ¹⁷O NMR spectrum.

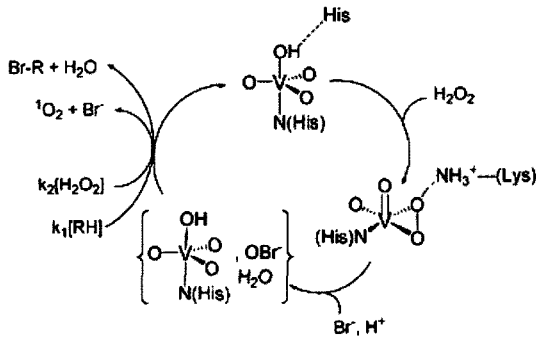


Fig. 4. 제안된 VBPO의 촉매 작용 메커니즘.

응하게 되는 bromide의 결합위치는 K-edge EXAFS 연구를 통해서 vanadium 자리에 결합하지 않는 것이 관찰되어 ^{402}Ser 근처에 위치할 것으로 제안되었다.²¹⁾ 그러나 VCPO의 ^{402}Ser 을 alanine으로 치환하였을 때, 효소 활성의 변화가 거의 없는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾ 그러므로 bromide의 결합위치가 불확실하게 되었는데, 최근의 Br K-edge EXAFS 연구를 통해서 bromide가 active site 근처의 Tyr residue에 공유 결합되어 있음이 보고되었다.²²⁾

지금까지의 생화학 및 분광학적 연구에 바탕하여 vanadium haloperoxidase의 촉매 작용 기작이 제안되었다 (Fig. 4). Resting state의 trigonal bipyramidal 배위환경을 가지는 vanadate에 hydrogen peroxide가 hydroxide ion들을 치환하면서 vanadate에 결합하면, 배위환경의 변화가 일어나서 square pyramidal 구조의 peroxovanadate의 활성 중간체가 형성되고 (Fig. 2), bromide ion과 수소이온이 첨가되어 HOBr의 반응 활성종이 형성되게 된다. 여기에 다양한 기질이 들어오게 되면 brominated된 product가 형성되고, 기질 대신 다음 번 hydrogen peroxide가 들어오게 되면, bromide ion과 singlet oxygen이 형성되는 것이다.

VBPO가 Br⁻와 I⁻을 산화시킬 수 있는 반면에 VCPO는 peroxy complex 형성을 통해서 Cl⁻, Br⁻, I⁻와 같은 halogenides의 산화를 촉진하는데, VBPO와 마찬가지로 여기서 형성된 산화종(HOX)은 유기 기질을 halogenation 시키거나, 다음 hydrogen peroxide를 산화시켜서 singlet oxygen을 형성한다. 유기 기질의 halogenation은 HOX 중에 의해서 일어나는데, radical mechanism이 아니라 electrophilic

mechanism을 따르는 것으로 알려져 있다.²³⁾

3. Vanadium haloperoxidase의 반응성

바다 조류에서는 halogen을 포함하고 있는 in-doles, terpenes, acetogenins, phenols과 함께 bromoform, chloroform, dibromomethane을 포함하는 volatile한 hydrocarbons 등의 secondary metabolites가 발견되는데, 이들은 antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, antiviral activities 등의 약리활성을 가지며, 일부는 tumor를 억제하는 작용도 있음이 보고되었다. Fig. 5에서는 red algae에서 분리된 천연물들을 보여주고 있는데, thysifyryl acetate (I)는 protein phosphatase를 저해하고, halomon(II)은 antitumor와 cytotoxic 작용이 있으며 ma'ilione (III)은 anthelminthic 성질이 있다. Brominated된 furanone(IV)과 cyclized sesquiterpenes(V, VI)은 anti-fouling 성질과 broad spectrum의 antimicrobial 활성이 각각 발견된다. 그리고, brominated cyclized acetogenin(VII)은 antiviral 활성이 있다.²⁴⁾

일반적으로 유기합성에서 사용되는 halogenation은 radical 반응과 electrophilic addition 반응에 의해 얻어지며, 이들 반응의 특징은 regioselectivity

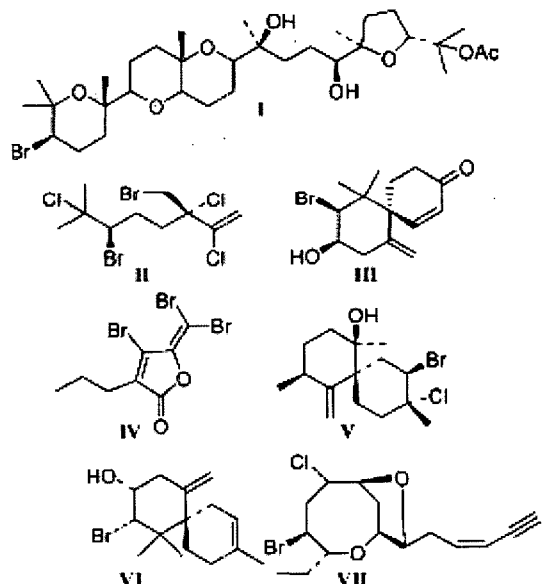


Fig. 5. Marine red algae로부터 분리된 halogenated natural products.

가 매우 떨어지며, 입체선택성이 거의 없다는 것이다. 반면에 VPO에 의해서 진행되는 halogenation 반응은 반응 수율 뿐 아니라, regioselectivity와 입체선택성이 매우 높아서 VPO의 반응성에 관한 연구는 생리활성 물질의 생산이나 의약품으로의 적용에 관련하여 산업적으로 매우 중요하다.

방향족화합물의 bromination에서 VPO는 탁월한 regioselectivity를 보인다. 1,3-Di-*tert*-butylindole을 VBPO로 반응시키면, regioselective하게 1,3-di-

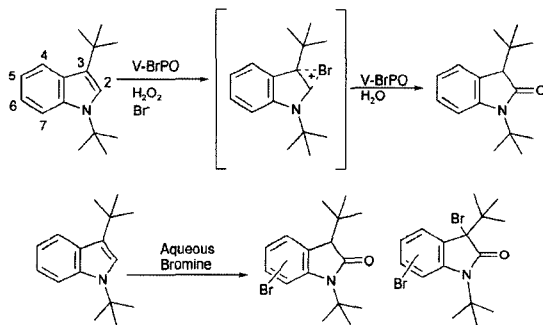


Fig. 6. VBPO에 의한 regioselective bromination of 1,3-di-*tert*-butylindole.

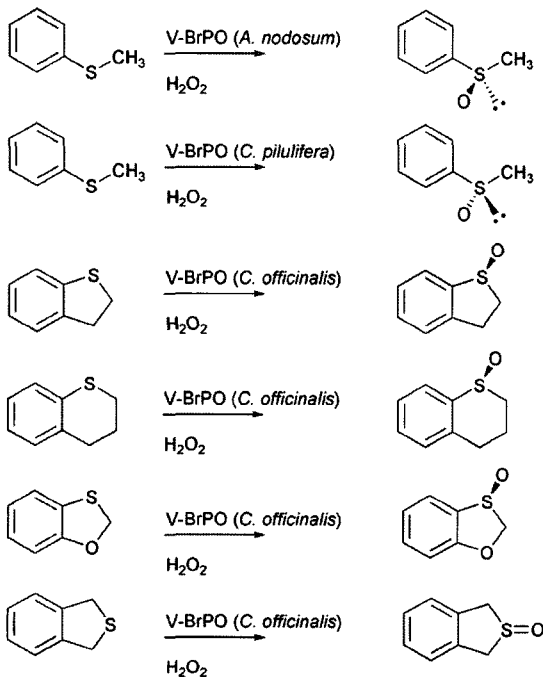


Fig. 7. VBPO에 의해 진행되는 다양한 sulfoxidation.

tert-butyl-2-indolinone이 형성되는데, 이는 indole ring의 C2-C3 이중결합에 bromide의 electrophilic adduct가 중간체로 형성되었기 때문이다(Fig. 6).²⁵⁾ 이 결과는 또한 촉매과정 동안 enzyme-trapped 또는 enzyme-bound brominating intermediate가 존재

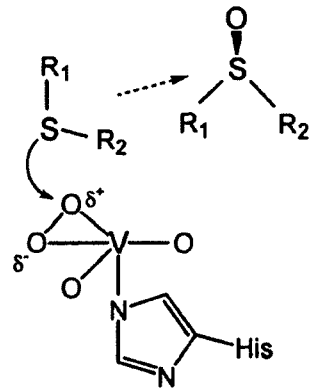


Fig. 8. VBPO에 의한 sulfoxidation에서의 산소원자 전달 메커니즘.

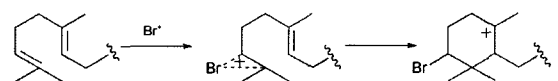


Fig. 9. 이론적인 brominium ion에 의한 terpene precursor의 cyclization.

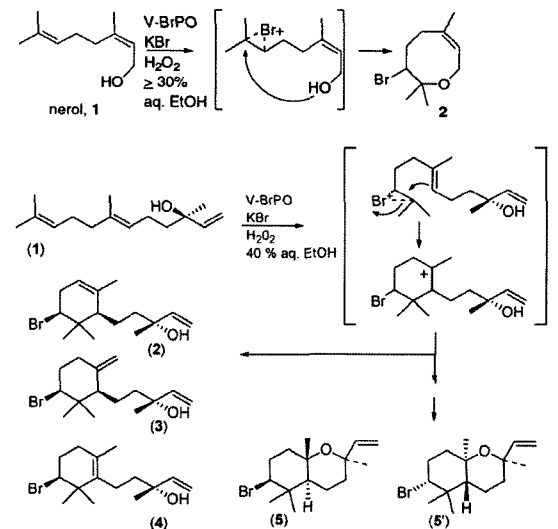


Fig. 10. VBPO에 의한 nerol(위쪽 그림)과 (*E*)-(+)-nerolidol(아래쪽 그림)의 cyclization.

함을 보여준다.²³⁾ 촉매과정에서 형성되는 oxoper-oxovanadium(+5) 활성종은 halide ions 이 없을 때, non-heme Fe oxygenase와는 달리, epoxidation이나 hydroxylation을 일으키지 않는데, hydrogen peroxide로부터 singlet oxygen을 형성하는 것으로 보고되었다. Singlet oxygen을 이용한 유기 반응에는 주로 sensitizer와 빛을 이용한 반응이 주로 쓰이는데, 이 방법은 효율이 그리 좋지 못해 vanadium haloperoxidase를 사용할 경우 빛이 없는 조건에서도 singlet oxygen을 생성해서 유기 반응을 진행할 수

있다. Singlet oxygen 생성에는 VCPO가 VBPO보다 더 좋은 것으로 보고되었다.⁹⁾

Sulfides를 기질로 하였을 때는 다른 유기 기질이 없는 조건에서 sulfoxides를 형성하는 것이 보고되었다.²⁶⁾ Sulfoxidation 반응에서 hydrogen peroxide의 양이나 첨가 속도가 sulfoxide 형성의 수율과 enantioselectivity에 영향을 주는 것으로 밝혀졌는데, *A. nodosum*에서 분리된 VBPO는 thioanisole을 (*R*)-anantiomer로 91% ee로 전환하였고, *C. pilulifera*에서 분리된 VBPO는 (*S*)-anantiomer를

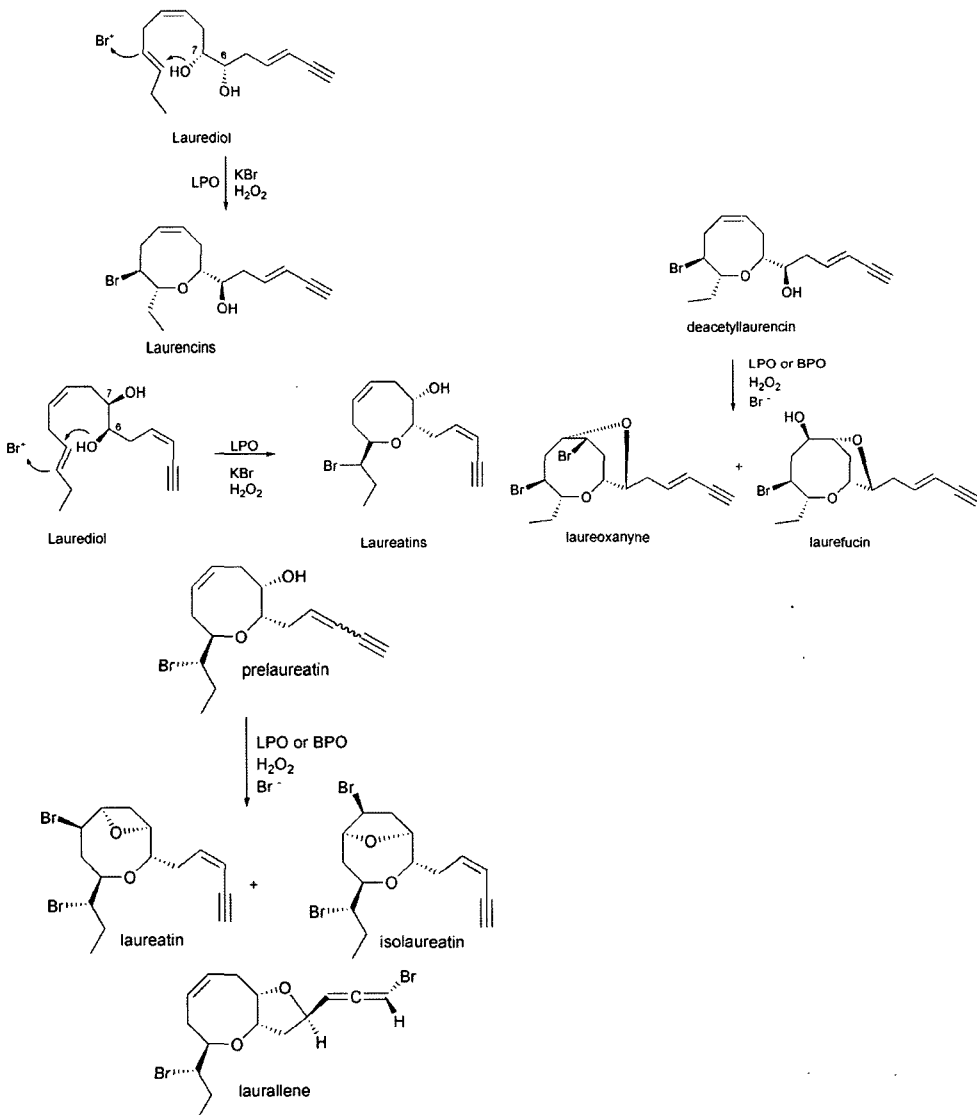


Fig. 11. 제안된 LPO와 BPO에 의한 lauroxocanes의 생합성 경로.

55% ee로 전환하였다. 실제로 효소의 출처에 따라 다른 입체선택성을 가지는 것으로 보고되었다 (Fig. 7). 전달된 산소원자의 근원을 알기 위해서 $H_2^{18}O_2$ 을 사용하여 실험을 하였는데, peroxide로부터 직접 산소원자가 기질로 전달됨이 밝혀졌다 (Fig. 8).²⁷⁾ 이러한 enantioselective sulfoxidation은 산업적으로 중요한 응용을 가지는데, 70°C의 고온에서도 효소 활성이 유지되었다.

4. Halogenated marine natural products의 생합성에서 VBPO의 역할

해양 천연물 가운데 다수를 차지하는 것은 halogenated sesquiterpenes이다. 대부분의 halogenated cyclic sesquiterpenes은 acyclic terpene precursor에서 brominium ion induced cyclization을 거쳐서 생합성 되는 것으로 생각된다 (Fig. 9). 실제로 Carter-Franklin 등은 nerol과 (*E*)-(+)-nerolidol의 cyclization에 VBPO가 관여함을 보고하였으며 이들은 brominium ion induced cyclization을 따르는 것으로 제안되었다 (Fig. 10).^{24,28)}

Halogenated acetogenins는 oxane ring의 크기, enyne과 allenic side chains, 그리고 하나 이상의 bromide에 의해 다양한 구조를 보인다. Lauroxocanes는 laurencia acetogenins에서 가장 큰 그룹을 형성하는데, laurencin과 laureatin type의 구조로 이루어져 있다. Fig. 11은 lactoperoxidase(LPO)와 bromoperoxidase(BPO)에 의한 lauroxocanes의 생합성을 보여준다.

Vanadium haloperoxidase의 작용기작이 연구되면서 더 많은 VPO들이 분리되었으며, 효소의 유전자를 조절할 수 있게 됨에 따라 생물공학적인 응용이 시도되었다. 먼저, VBPO와 acid phosphatase의 아미노산 서열이 유사하고 VBPO가 phosphate를 결합한다는 사실에 착안하여 (Fig. 1), *Shigella flexneri*의 acid phosphatase에 vanadate를 치환하여 VBPO의 활성을 띠게 하였다.²⁹⁾ 그 결과 reconstructed acid phosphatase는 VBPO와 같이 thioanisole의 anantioselective하게 sulfoxidation시켰으나, 그 turnover frequency가 VBPO에 비해 낮았다. 또한, *C. officinalis*의 VBPO를 *Eshcherichia coli*와

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시키서 native VBPO와 비슷한 활성을 가지는 효소를 분리하여 VBPO의 대량생산의 길을 열었다.^{17,30)} 특히, *S. cerevisiae*에서 발현한 효소는 native 효소보다도 열에 대한 저항성이 매우 높아 산업적 적용이 기대된다.

참고문헌

- 1) RCSB Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- 2) Lippard, S. J. and Berg, J. M., 'Principles of Bioinorganic Chemistry' pp. 283-347. University Science Books, California (1994).
- 3) Littlechild, J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 28-34 (1999).
- 4) Yeh, E., Garneau, S. and Walsh, C. T., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **102**, 3960-3965 (2005).
- 5) Vilter, H., *Phytochemistry*, **23**, 1387-1390 (1984).
- 6) Ohsawa, N., Ogata, Y., Okada, N. and Itoh, N., *Phytochemistry*, **58**, 683-692 (2001).
- 7) De Boer, E., Boon, K. and Wever, R., *Biochemistry*, **27**, 1629-1635 (1988).
- 8) Hormes, J., Kuetgens, U., Chauvistre, R., Schreiber, W., Anders, N., Vilter, H., Rehder, D. and Weidemann, C., *Biochim. Biophys. Acta*, **956**, 293-299 (1988).
- 9) Renirie, R., Rierlot, C., Aubry, J.-M., Hartog, A. F., Schoemaker, H. E., Alsters, P. L. and Wever, R., *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 849-858 (2003).
- 10) Wever, R., Plat, H. and de Boer, E., *Biochim. Biophys. Acta*, **830**, 181-186 (1985).
- 11) Rorrer, G. L., Tucker, M. P., Cheney, D. P. and Maliakal, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **74**, 389-395 (2001).
- 12) Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **131**, 428-435 (1985).
- 13) Sheffield, D. J., Harry, T. R., Smith, A. J. and Rogers, L. J., *Phytochemistry*, **32**, 21-26 (1993).
- 14) Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M. F., Melo, R., Severino, N., da Silva, J. A. L., Fraústo da Silva, J. J. R. and Wever, R., *Phytochemistry*, **57**, 633-642 (2001).
- 15) Littlechild, J. and Garcia-Rodriguez, E., *Coord. Chem. Rev.*, **237**, 65-76 (2003).
- 16) Isupov, M. N., Dalby, A. R., Brindley, A. A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G. N. and

- Littlechild, J. A., *J. Mol. Biol.*, **299**, 1035-1049 (2000).
- 17) Cater, J. N., Beatty, K. E., Simpson, M. T. and Butler, A., *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 59-69 (2002).
- 18) Tanaka, N., Hasan, Z. and Wever, R., *Inorg. Chim. Acta*, **356**, 288-296 (2003).
- 19) Hemrika, W., Renirie, R., Macedo-Ribeiro, S., Messerschmidt, A. and Wever, R., *J. Biol. Chem.*, **274**, 23820-23827 (1999).
- 20) Cäsny, M., Rehder, D., Schmidt, H., Vilter, H. and Conte, V., *J. Inorg. Biochem.*, **80**, 157-160 (2000).
- 21) Dau, H., Dittmer, J., Epple, M., Hanss, J., Kiss, E., Rehder, D., Schulzke, C. and Vilter, H., *FEBS Lett.* 237-240 (1999).
- 22) Feiters, M. C., Leblanc, G., Küpper, F. C., Meyer-Klaucke, W., Michel, G. and Potin, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15340-15341 (2005).
- 23) Soedjak, H. S., Walker, J. V. and Butler, A., *Biochemistry*, **34**, 12689-12696 (1995).
- 24) Carter-Franklin, J. N. and Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15060-15066 (2004) and references therein.
- 25) Martinez, J. S., Carroll, G. L., Tschirret-Guth, R. A., Altenhoff, G., Little, R. D. and Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3289-3294 (2001).
- 26) Ten Brink, H. B., Tuynman, A., Dekker, H. L., Hemrika, W., Izumi, Y., Oshiro, T., Schoemaker, H. E. and Wever, R., *Inorg. Chem.*, **37**, 6780-6784 (1998).
- 27) Ten Brink, H. B., Schoemaker, H. E. and Wever, R., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 132-138 (2001).
- 28) Carter-Franklin, J. N., Parrish, J. D., Tschirret-Guth, R. A., Little, R. D. and Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3688-3689 (2003).
- 29) Tanaka, N., Dumay, V., Liao, Q., Lange, A. J. and Wever, R., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2162-2167 (2002).
- 30) Ohshiro, T., Hemrika, W., Aibara, T., Wever, R. and Izumu, Y., *Phytochemistry*, **60**, 595-601 (2002).