

Molecular characterization of enzymes involved in lignin degradation by *Pleurotus* species

Pleurotus 種によるリグニン分解に関与する酵素の分子的性質

Javier Ruiz-Dueñas¹, María Morales¹, María Jesús Martínez¹, Rebecca Pogni², Ricardo Basosi², Klaus Piontek³, and Ángel T. Martínez¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain

²Department of Chemistry, University of Siena, via Aldo Moro, I-53100 Siena, Italy

³Institute of Biochemistry, ETH, Schafmattstrasse 18, CH-8093 Zürich, Switzerland

要約

Pleurotus 種は、2年前にそのゲノムが完全に明らかにされているモデル菌 *Phanerochaete chrysosporium* において見いだされているものとは異なったリグニン分解酵素群を産生する。*P.chrysosporium* においてはリグニンペルオキシダーゼ(LiP)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP) およびグリオキサロキシダーゼについては詳細に検討されているが、ヴァーサタイルペルオキシダーゼ(VP) (訳者注: versatileには多機能という意味もあるが、ここでは和訳せず原文のままとする) アリルアルコールオキシダーゼ、ラッカーゼは *Pleurotus* に特徴的なものであることが明らかになってきている。VPは他のLiPやMnPと並んでリグニン分解性ペルオキシダーゼの第3のファミリーを形成するが故に、特別に興味の対象となってきている。結晶学、分光学的解析および部位特異的変異などで得られた結果を総合して、この酵素はハイブリッド型分子構造を有していることが示された。このことはこの酵素がマンガン (Mn^{3+} が拡散可能な酸化剤として働く) だけでなく高い酸化還元電位を有する芳香族化合物や色素を酸化することの裏付けとなっている。後者の基質は、酵素の表面に露出したトリプトファン残基からの長距離電子移動によって酸化される。これによって、触媒反応の間自動的に水酸化されないLiPとは対照的に、タンパクラジカルが生成する。一方、 Mn^{2+} はMnPについて報告されているよりも特徴的に高い柔軟性をもって結合サイトにおいてヘムコファクターにより直接酸化される。このような結果を考慮して、ここでは最新のVPの触媒サイクルについて論議する。*Pleurotus* 種の栽培は最近世界的に極めて増加しており、*Pleurotus*のリグニン分解性酸化還元酵素やこれらの菌類の生物学的な他の観点についての将来の研究は、近年開始された*Pleurotus*ゲノムプロジェクトで得られる結果によって強く推進されるであろう。*Pleurotus*がリグニン分解研究において第2のモデル種になると結論できる。

1. リグニン分解研究におけるモデル菌類

リグニン生分解の研究のほとんどは白色腐朽性担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* (ヒダナシタケ目、コウヤクタケ科)に焦点を当てて行われたものである(1-6)。これらの研究の応用的な対象は漂白した紙パルプの製造におけるリグニンやリグニンに由来する物質を除去するための(微生物的あるいは酵素的)クリーンテクノロジーの開発であった。リグニン分解の生物システムはまた、工業的あるいは環境的な応用(バイオエタノール生産を含む)においても関心が持たれている。最初のリグニン分解性ペルオキシダーゼは *P.chrysosporium* において 1983-1984 に見いだされ、1987 においてクローン化され、さらにその結晶構造は 1993-1994 において明らかにされた。従って、この菌は生化学、分子生物学、酵素構造 - 機能研究などにわたるリグニン分解研究のモデル生物となってきた。リグノセルロース利用の分野における生物工学的な応用開発への関心から、この菌はアメリカエネルギー省(DOE) Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) においてゲノム配列解明の候補として選ばれた。この菌の完全なゲノムの最初のドラフトは既に 2 年前に利用可能となっており、ゲノムの構造が明らかにされた最初の担子菌となった。

しかし、他の白色腐朽菌の方がリグニンを選択的に分解する能力があるため、工業的な利用により適している。すなわち、それらがセルロースに対して限定的な攻撃を行うのに対し、*P.chrysosporium* はセルロースとリグニンを同時に分解する。このような菌には生物 - 機械パルプの研究において最も注目を浴びる菌となった *Ceriporiopsis subvermispora* (ヒダナシ目、カワラタケ科) (8)や、非木質系のリグノセルロース物質から脱リグニンを行う能力のある菌としてよく知られている *Pleurotus* (ハラタケ目、ヒラタケ科)が含まれる(9)。*Pleurotus* 種に対する関心は *Pleurotus ostreatus* とその関連種が *Agaricus bisporus* (ハラタケ目、ハラタケ科) や *Lentinus edodes* (ハラタケ目、キシメジ科) (10)に続いて世界的に最も重要な栽培品種であること、また、その生産が近年急速に増加していることによってさらに高まっている。

上記の状況により、スペインNavarre Public University のA. D. PisbarroとL. Ramirezにより主導された*Pleurotus* のシーケンスプロジェクトが 2006 年 6 月にDOE Joint Genome Instituteにより取り上げられることになった。この研究にはCIB, CSIC, Madrid を含む 8 ヶ国のグループが参加している。報道発表(http://www.jgi.doe.gov/News/news_7_11_06.html) は「異なる系統樹上の分枝に属し、異なる一連のリグニン分解酵素を持っているこの生物はこれまでDOE JGIにより配列が決定された白色腐朽菌*Phanerochaete chrysosporium* のゲノムに対する有用な比較菌として役立つであろう」としている。

2. リグニン分解に関与している *Pleurotus* の酸化還元酵素

われわれの *Pleurotus eryngii* のリグニン分解酵素に関する研究は、先の報道発表に述べたよう

に、*Pleurotus* に特有であるが *P.chrysosporium* には欠けている 3つの酸化還元酵素に関するものである。これらの酵素とは 2つのヴァーサタイルペルオキシダーゼ(VP)、1つのアリルアルコールオキシダーゼ(AAO)およびいくつかのラッカーゼである(11)。ラッカーゼの産生は長い間褐色腐朽菌に比較して白色腐朽菌の特徴の一つであると考えられてきたが、*Peryngii* も例外ではない(12)。しかし、*P.chrysosporium* ゲノムの完全シーケンス解析が行われたことにより、フェロオキシダーゼの存在と典型的なラッカーゼ遺伝子の欠如を示され(7)、この菌によるラッカーゼの産生の可能性についての論議は数年前に終結した。驚くべきことに、*Pleurotus* の 2つの菌体外酸化還元酵素(VP および AAO)はまた、*Bjerkandera adusta* (*Aphyllphorales* family であり、系統学的には *Coriolaceae* とは関連性がない)によっても産生することであり(13-15)、また、これらの酵素は他のほとんどの白色腐朽菌においては論議されていなかった。

リグニン分解性ペルオキシダーゼは *P.chrysosporium* のグリオキサロオキシダーゼ(16)や *Pleurotus* の AAO(17)のような菌体外酸化酵素によって生成される過酸化水素を使ってリグニンの酸化的分解を触媒するが、これは基本的には、森林生態系における炭素の循環の鍵となるステップとなるような細胞外プロセスである(3)。リグニンの酸化に必要とされる高い酸化還元電位を持つため、リグニン分解性ペルオキシダーゼは工業的な生体触媒として高い関心の対象となっている。リグニン分解性ペルオキシダーゼとは対照的に、ラッカーゼはリグニンを適当な酸化還元メディエーターの存在下においてのみ分解できる(18)。VP は最初に *Peryngii* において見いだされ(19,20)、1999年にクローン化されたが(21)、その後のわれわれのリグニン分解性酸化還元酵素の立体構造 - 機能研究の重要な部分はこの VP にあてられるようになった。

3. ヴァーサタイルペルオキシダーゼ：ペルオキシダーゼClass II の第4のファミリー

VA(EC 1.11.1.16)は *P.chrysosporium* において最初に見いだされたリグニンペルオキシダーゼ(EC 1.11.1.14)やマンガンペルオキシダーゼ(EC 1.11.1.13)とともにリグニン分解性ペルオキシダーゼの新しいファミリーとして記載されている(22)。この菌の完全なゲノムは解析により”ハイブリッドペルオキシダーゼ”遺伝子の存在が明らかになったが、その配列は非リグニン分解性の CIP(23) よりもより VP に関連性が高いことを示している。これまでのところ、VP は *Pleurotus* や *Bjerkandera* (15, 19-21, 24-26)属の菌類によってのみ産生されることが報告されている。*Lepista irina* (ハラタケ目、キシメジ科)で報告されている VP(27)はまた *Peryngii* 酵素に相当している。VP に加えて、典型的な LiP は *B.adusta* によっても産生される(26,28)が、一方では、LiP は *Pleurotus* 種においてはこれまで報告されていない(この事実はこの菌の全ゲノムが明らかにされた時に確認されるであろう)。

この第4の糸状菌ペルオキシダーゼファミリーはMnP、LiP、CIPファミリーとともに、ペルオキシダーゼClass II (29)に含められるべきものである。VPについて最も顕著な点はこの酵素が他の3つの糸状菌ペルオキシダーゼファミリーに特徴的な基質特異性を併せ持っているということである。

ある。このように、この酵素は Mn^{2+} 、フェノール性および非フェノール性リグニン 2 量体、 β -ケト- β -チオメチル酪酸(KTBA)、ペラトリルアルコール、ジメトキシベンゼン類、種々のタイプの色素、フェノール誘導体、ヒドロキノン類など多様な基質（酸化還元電位の高低を問わず）を酸化する(13,30)。

訳者注：ペルオキシダーゼのクラスについて（文献 29 より）

Class I: 主として原核生物のペルオキシダーゼ（酵母のミトコンドリアチトクローム C ペルオキシダーゼ、遺伝子が重複した細菌のペルオキシダーゼ）、クロロプラスト及び細胞質にあるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ

Class II: 細胞外に分泌される菌類のペルオキシダーゼ（LiP、MnP、CIP、VP）

Class III: 植物から細胞外に分泌される典型的なペルオキシダーゼ

最近、*Peryngii*のVPについて、この新しいペルオキシダーゼファミリーの構造と機能の特徴を理解するため、種々の技術を用いて検討されている。新しいペルオキシダーゼの触媒としての特徴は、異なる基質結合部位と酸化部位を結びつけるような分子構築のハイブリッド性に起因しているということが示唆されている(31)。野生型とその組換え体(グリコシル化されていない)*Peryngii* VPの結晶構造は高解像度で決定された。その分子構造は長距離電子移動(LRET)を経由する芳香族基質の酸化に関与する露出したトリプトファン残基と推定 Mn^{2+} -酸化部位の存在を示している。

4. 芳香族化合物の長距離電子移動酸化

LRET はチトクローム c ペルオキシダーゼ(CCP)のような酸化還元タンパクにおいて機能していることが報告されている。このヘムを含む酵素はチトクローム C をタンパク表面において酸化し、電子を 3 つのアミノ酸残基を経緯しヘムコファクターの近傍に位置する安定な Trp ラジカルに転移する(32, 33)。分子内 LRET はいくつかの他のタンパクにおいても存在する。たとえば、DNA フォトリアーゼでは、そのフラビンコファクターが他の 2 つの芳香族アミノ酸が係わる電子移動経路において Trp 残基により還元される(34)。リグニン分解における LRET では、i) ペルオキシダーゼ分子内で、リグニンのヘムコファクターへの接近を妨げるような立体的な障害を克服するように、さらに、ii) リグニン高分子自身において、酵素からある程度離れたところで最も不安定になっている構造単位間の結合の分解を引き起こすように、機能している(35,36)。

Peryngii の VP アイソザイムの同型置換法に加えて、高解像度結晶構造(1.1 Å で解析された)により、高酸化還元電位の芳香族化合物の酸化のため LRET の 3 つの可能性が明らかにされている。この可能な経路は、VPL では Trp164 あるいは His232 で、また、アイソザイム VPS1 では His82 あるいは Trp170 から始まる。これらの残基は酵素表面に露出しており、ヘムから 11 Å よりも短距離に位置する。それらの機能を検討するため、2 つの単独の変異(W164s と H232F)と 1 つの二

重変異を VPL に導入し、I) このアイソザイムの 2 つの経路を除去し、また、II) 欠如していると予想される経路を導入することを試みた。

変異型酵素の解析から、Trp164 が 2 つの高酸化還元性電位を持つ基質 (ベラトリルアルコールおよびリラティブブラック 5) の酸化に必要であることが示されたが、他の二つの経路 (His232 および His82 が起点になる) は LRET に関与しないことが分かった。リグニンと相互作用する LiP の残基と相同性を示すのは VP の His の Trp164 の同様な役割をしていたのは、LiP の Trp171 であった(37)。どのような変異も Mn²⁺の酸化に影響を与えなかったが、これは酵素の逆の部位に変異が生じたためであろう。Trp164 をヒスチジン残基で置換することによっても非活性の変異株が得られたことは、インドール側鎖が活性に必須であることを示している。232 と報告されていたが(38)、VP

基質の酸化はタンパク自身のラジカルを経由して行われることが提案されている。リグニン分解性ペルオキシダーゼにおいては、過酸化水素により活性化された VP の低温電子平行磁場共鳴 (EPR) 解析によりはじめて、そのような中間体分子が Trp164 の位置で中性のラジカルとして検出された(39,40)。Trp164 はまた VP の自己還元反応にも関与しているが、このことは W164S 変異株において Compound II の段階で反応が停止していることで示された。原子間の解像度をあげて VP の結晶構造を解析しても Trp164Cb 原子の水酸化は観察されなかった (数倍等量の過酸化水素を添加した後においても)。このことは LiP の Trp171 とは対照的である(41,42)。両ペルオキシダーゼ結晶構造はその反応性に影響を与えるべきタンパクラジカル環境に相違があることを示している。これらの変異はまた、LiP が (酵素のメディエーターとして作用する) ベラトリルアルコールの存在下においてのみ酸化することができるような高い酸化還元電位を持つ芳香族化合物の酸化反応での相違を説明することになるであろう(13)。

5. Mn²⁺ 酸化部位

Mn²⁺のMn³⁺への酵素的酸化は、リグニン分解に関与している菌類パーオキシダーゼ (MnPとVP) のユニークな特徴であり(2,4)、それはまた、原核生物のカタラーゼ - ペルオキシダーゼにおいて報告されている(43)。Mn³⁺は白色腐朽菌により合成された有機酸によりキレートされ、フェノール性リグニンユニットに対する拡散性の酸化剤として作用し(44-46)、また、過酸化脂質の存在下では非フェノール性の酸化剤としても同様に作用する(47)。Mn²⁺への接触の前後での野生型と組換え体VPの結晶構造は、Asp175 と協調してMn²⁺ の配置決定に寄与するであろうGlu36とGlu40の側鎖の位置が様々に変化することを示した。これらの残基の関与を評価するため、部位特異的変異を行った。

E36A、E40AおよびD175A変異型酵素はMn²⁺活性 (k_{cat}) の減少をもたらしたが、それらの主な効果は、親和性を 1/60-1/80 に減少したことである。遷移状態定数は、Compound II が

1/1,000—1/10,000 に減少しただけでなく、Compound I も 1/80—1/325 に減少したことも示した。しかしながら、 Mn^{2+} 酸化部位は依然として機能しており、活性を (k_{cat} を 1% 以下にするように) 抑えるには、三重変異株 (E36A/E40A/D175A) が必要であった。メチレン基 (CH_2) 一つ分短くした変異型酵素 E36D と E40D の Mn^{2+} に対する親和性は 1/25 に減少したが、最大活性の 30-50% の活性を保持していた (E40D 反応の compound I では Mn^{2+} の酸化には比較的效果があったが)、その一方、マンガンパーオキシダーゼ (MnP) での同様な変異型酵素の k_{cat} は 1/50—1/100 に減少した(48)。

追加して構築した変異型酵素については以下の二つのことが分かった。i) 175(A173R) の近くに塩基性アミノ酸残基を導入した変異型酵素では、いくつか基質に対する活性が増加したにも関わらず、MnP で見られたような効果的な Mn^{2+} 酸化の改善は見られない(49)。ii) Mn^{2+} の酸化効果を低下させるような末端のカルボキシル基の関与は排除される。得られた立体構造と反応速度論データから、VP と MnP の Mn^{2+} 酸化部位の顕著な違いが明らかになった。

6. 更新されたVP触媒サイクル

上述した結果を考慮して、Ruiz-Duenas らにより提案された基本的なVPの触媒サイクル(21)は、ベラトリルアルコールや(リグニンを含む)他の高酸化還元電位基質の酸化に相当する部分についてはあるが、Fig. 1 に示すような形で完成した(40)。書き換えたところは2つのペルオキシダーゼ型の存在を追加したことで、これらはCCPのCompound II で使用された(50) 2型の名前をそのまま使ってCompound I_B とII_B と表示している。特徴は1酸化等量が1 Trpラジカルになることである。これらは、古典的なCompound I と II (ここでは新たにCompound I_A とII_B と呼ばれる)と同じであるが、上述の酸化等量はポルフィリンカチオンラジカルとFe⁴⁺-oxo、のそれぞれを形成する。

二つの平衡反応におけるA体とB体のそれぞれの割合は様々であり、そしてその触媒反応への関与は酸化し得る基質の多様性に依存しているのであろう。言い換えると“古典的な”compound I_A とII_Aは Mn^{2+} の酸化過程の主要な中間体となる一方で、ある程度の割合のタンパクラジカル体がベラトリルアルコールの酸化に必要であろう。EPR解析の結果は、VPのTrp164 ラジカルがCompound I と平衡して存在していることを示した(40)。Compound II_B の存在は触媒反応に必要であり、CCPのそれはpH 5で全Compound II の10%であるが(51)、VPのそれは直接的にはその存在が示されていない。

7. Acknowledgements

This research was supported by the EU contract FP6-2004-NMP-NI-4-02456, and the Spanish projects BIO2002-1166 and BIO2005-02224. F.J.R.-D. thanks CSIC for an I3P contract and the

Spanish MEC for a project contract, and M.M. thanks CSIC for an I3P fellowship. The use of the protein beamline at the SLS (Villigen, Switzerland) and DESY (Hamburg, Switzerland) synchrotrons are gratefully acknowledged.

8. References

1. Kirk, T. K. and D. Cullen. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi, p. 273-308. In R. A. Young and M. Akhtar (eds.), Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. TAPPI Press, Atlanta.
2. Martínez, A. T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30:425-444.
3. Kirk, T. K. and R. L. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
4. Gold, M. H., H. L. Youngs, and M. D. Gelpke. 2000. Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* 37:559-586.
5. Gold, M. H. and M. Alic. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57:605-622.
6. Higuchi, T. 2004. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad. B* 80:204-214.
7. Martínez, D., L. F. Larrondo, N. Putnam, M. D. Gelpke, K. Huang, J. Chapman, K. G. Helfenbein, P. Ramaiya, J. C. Detter, F. Larimer, P. M. Coutinho, B. Henrissat, R. Berka, D. Cullen, and D. Rokhsar. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22:695-700.
8. Young, R. A. and M. Akhtar. 1998. Environmentally-friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley and Sons, New York.
9. Martínez, A. T., S. Camarero, F. Guillén, A. Gutiérrez, C. Muñoz, E. Varela, M. J. Martínez, J. M. Barrasa, K. Ruel, and M. Pelayo. 1994. Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:265-274.
10. Chang, S.-T. 1999. World production of cultivated edible mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *Int. J. Med. Mushrooms* 1:291-300.
11. Martínez, A. T., M. Speranza, F. J. Ruiz-Dueñas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillén, M. J. Martínez, A. Gutiérrez, and J. C. del Río. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8:195-204.
12. Muñoz, C., F. Guillén, A. T. Martínez, and M. J. Martínez. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of

- molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2166-2174.
13. Heinfling, A., F. J. Ruiz-Dueñas, M. J. Martínez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, and A. T. Martínez. 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428:141-146.
 14. Muheim, A., M. S. A. Leisola, and H. E. Schoemaker. 1990. Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *J. Biotechnol.* 13:159-167.
 15. Mester, T. and J. A. Field. 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273:15412-15417.
 16. Kersten, P. J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2936-2940.
 17. Guillén, F. and C. S. Evans. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2811-2817.
 18. Bourbonnais, R. and M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
 19. Martínez, M. J., F. J. Ruiz-Dueñas, F. Guillén, and A. T. Martínez. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237:424-432.
 20. Martínez, M. J. and A. T. Martínez. 1996. Characterization of MnP isoenzymes of *Pleurotus eryngii* exhibiting Mn-independent activities on 2,6-dimethoxyphenol and veratryl alcohol, p. 417-420. *In* K. Messner and E. Srebotnik (eds.), *Biotechnology in the pulp and paper industry: Recent advances in applied and fundamental research*. *Facultas-Universitätsverlag*, Vienna.
 21. Ruiz-Dueñas, F. J., M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31:223-236.
 22. Ruiz-Dueñas, F. J., S. Camarero, M. Pérez-Boada, M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29:116-122.
 23. Baunsgaard, L., H. Dalboge, G. Houen, E. M. Rasmussen, and K. G. Welinder. 1993. Amino acid sequence of *Coprinus macrorhizus* peroxidase and cDNA sequence encoding *Coprinus cinereus* peroxidase - A new family of fungal peroxidases. *Eur. J. Biochem.* 213:605-611.
 24. Camarero, S., B. Böckle, M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1996. Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1070-1072.
 25. Sarkar, S., A. T. Martínez, and M. J. Martínez. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys Acta* 1339:23-30.
 26. Heinfling, A., M. J. Martínez, A. T. Martínez, M. Bergbauer, and U. Szewzyk. 1998.

- Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. FEMS Microbiol. Lett. 165:43-50.
27. Zorn, H., S. Langhoff, M. Scheibner, M. Nimtz, and R. G. Berger. 2003. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. Biol. Chem. 384:1049-1056.
 28. Kimura, Y., Y. Asada, T. Oka, and M. Kuwahara. 1991. Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:510-514.
 29. Welinder, K. G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Struct. Biol. 2:388-393.
 30. Caramelo, L., M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1996. A study of ligninolytic peroxidases in *Pleurotus* species using α -keto- γ -methylthiobutyric acid (KTBA). Abs. Intern. Union Microbiol. Soc. Symp. , Jerusalem, 18-23 August.
 31. Camarero, S., S. Sarkar, F. J. Ruiz-Dueñas, M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. J. Biol. Chem. 274:10324-10330.
 32. Beratan, D. N., J. N. Onuchic, J. R. Winkler, and H. B. Gray. 1992. Electron-tunneling pathways in proteins. Science 258:1740-1741.
 33. Pelletier, H. and J. Kraut. 1992. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. Science 258:1748-1755.
 34. Aubert, C., P. Mathis, A. P. Eker, and K. Brettel. 1999. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5423-5427.
 35. Harvey, P. J. and J. M. Palmer. 1990. Oxidation of phenolic compounds by ligninase. J. Biotechnol. 13:169-179.
 36. Schoemaker, H. E., T. K. Lundell, R. Floris, T. Glumoff, K. H. Winterhalter, and K. Piontek. 1994. Do carbohydrates play a role in lignin peroxidase cycle? Redox catalysis in the endergonic region of the driving force. Bioorgan. Med. Chem. 2:509-519.
 37. Doyle, W. A., W. Blodig, N. C. Veitch, K. Piontek, and A. T. Smith. 1998. Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. Biochemistry 37:15097-15105.
 38. Johjima, T., H. Itoh, M. Kabuto, F. Tokimura, T. Nakagawa, H. Wariishi, and H. Tanaka. 1999. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1989-1994.
 39. Pogni, R., M. C. Baratto, C. Teutloff, S. Giansanti, F. J. Ruiz-Dueñas, T. Choinowski, K. Piontek, A. T. Martínez, F. Lendzian, and R. Basosi. 2006. A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multi-frequency EPR and DFT study. J. Biol. Chem. 281:9517-9526.

40. Pérez-Boada, M., F. J. Ruiz-Dueñas, R. Pogni, R. Basosi, T. Choinowski, M. J. Martínez, K. Piontek, and A. T. Martínez. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 345:385-402.
41. Choinowski, T., W. Blodig, K. Winterhalter, and K. Piontek. 1999. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxyl group on the C_β of tryptophan 171: A novel radical site formed during redox cycle. *J. Mol. Biol.* 286:809-827.
42. Blodig, W., W. A. Doyle, A. T. Smith, K. Winterhalter, T. H. Choinowski, and K. Piontek. 1998. Autocatalytic formation of hydroxy group at C_β of Trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* 37:8832-8838.
43. Magliozzo, R. S. and J. A. Marcinkeviciene. 1997. The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of the antibiotic isoniazid. *J. Biol. Chem.* 272:8867-8870.
44. Wariishi, H., K. Valli, and M. H. Gold. 1989. Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28:6017-6023.
45. Kofujita, H., Y. Asada, and M. Kuwahara. 1991. Alkyl-aryl cleavage of phenolic β-O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Mokuzai Gakkaishi* 37:555-561.
46. Caramelo, L., M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1999. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α-keto-γ-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:916-922.
47. Bao, W. L., Y. Fukushima, K. A. Jensen, M. A. Moen, and K. E. Hammel. 1994. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* 354:297-300.
48. Kishi, K., M. Kusters-van Someren, M. B. Mayfield, J. Sun, T. M. Loehr, and M. H. Gold. 1996. Characterization of manganese(II) binding site mutants of manganese peroxidase. *Biochemistry* 35:8986-8994.
49. Gelpke, M. D. S., H. L. Youngs, and M. H. Gold. 2000. Role of arginine 177 in the Mn^{II} binding site of manganese peroxidase. Studies with R177D, R177E, R177N, and R177Q mutants. *Eur. J. Biochem.* 267:7038-7045.
50. Dunford, H. B. 1999. Heme peroxidases. Wiley-VCH, New York.
51. Ho, P. S., B. M. Hoffman, C. H. Kang, and E. Margoliash. 1983. Control of the transfer of oxidizing equivalents between heme iron and free radical site in yeast cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.* 258:4356-4363.

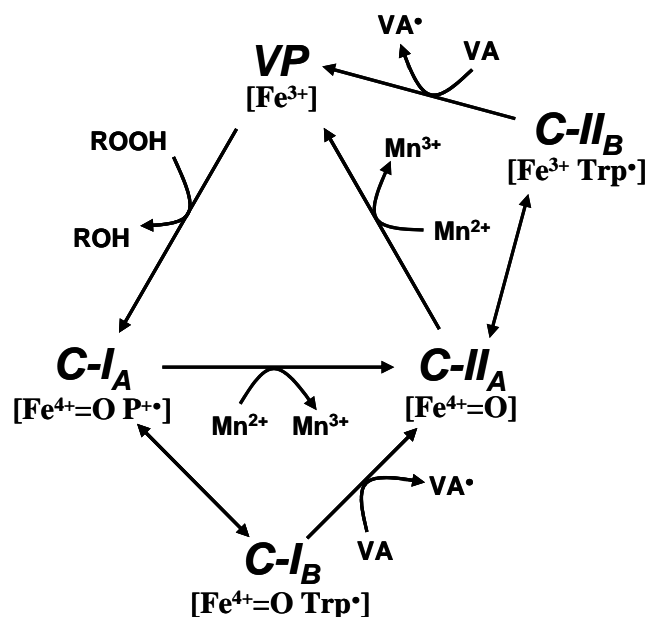


図-1 更新された VP 触媒サイクル

このスキームは次のことを示している。i) 過酸化水素誘導体による休止ペルオキシダーゼ (VP、 Fe^{3+} を持つ) の 2 電子酸化が行われて古典的なCompound-I (C-I_A、 Fe^{4+} -oxoとTrpラジカルを持つ)が生成する基礎的なVPサイクル。2 回の 1 電子反応においてはCompound-Iの Mn^{2+} による還元により古典的なCompound-II (C-II_A、ポルフィリンの還元の後 Fe^{4+} -oxoを持つ)と休止VPが生成する。ii) ベラトリルアルコールの酸化に係わっているCompound I_B (C-I_B、 Fe^{4+} -oxo と Trp ラジカルを持つ)と II_B (C-II_B、 Fe^{3+} と Trp ラジカルを持つ)を含む拡張サイクル(40) (このサイクルにおいてはC-I_B と C-II_B はそれぞれC-I_A と C-II_A に対して平衡状態にある)。このスキームに示すように、VPはi) 芳香族基質(AH)を相当するラジカル(A \cdot)に、また、II) Mn^{2+} を Mn^{3+} に酸化する。他の低酸化還元電位の芳香族基質はおそらくA型およびB型の両者により酸化されると考えられるが、その反応は単純ではない。C-I_BとC-II_Bにおける活性トリプトファンはTrp164 である。

翻訳担当：桑原正章、志村洋一郎