

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 アリールアルコール酸化酵素の酵素学的機能解析

○ 田丸慶明, 梅澤 究, 吉田 誠(農工大農)

背景

担子菌 *C. cinerea* は多数の酸化還元酵素遺伝子をゲノム上に有しており、その中でも糖質関連酵素データベース(CAZy)においてAuxiliary Activity (AA) ファミリー_3.2に分類される27個の酵素遺伝子を保持していることを演者らは明らかとした。本菌が有するAA3.2酵素に関する報告例はこれまでになく、そのうちの1個をメタノール産性酵母 *Pichia pastoris* により異種宿主発現させたところ、多不飽和アルコールの酸化能、 H_2O_2 生成能を有するアリールアルコール酸化酵素(AAO)活性を有していた。本酵素は活性中心付近の基質特異性を左右すると思われる部位において既知のAAOとは異なったアミノ酸残基を保持することが予想されたため、本酵素の点変異導入および酵素学的機能解析を実施し、その部位が有する機能の解明を試みた。

アミノ酸配列解析

```

CcAAO 105 SSVNVMVHHF 114 411 VINFYLNPFPG 421 514 QSTTVVHPVGT 524
PeAAO 87 SSVHYMVMRR 97 392 FSNQWFHP-AI 401 496 NANTIFHPVGT 506
PpAAO 87 SSVHYMVMRR 97 392 FSNQWFHP-AL 401 496 NANTIFHPVGT 506
***:*** . * : : * . . : : * : : * * * *
    
```

図1. 既知AAOおよびCcAAO疎水性チャネル構成アミノ酸残基のアライメント配列解析

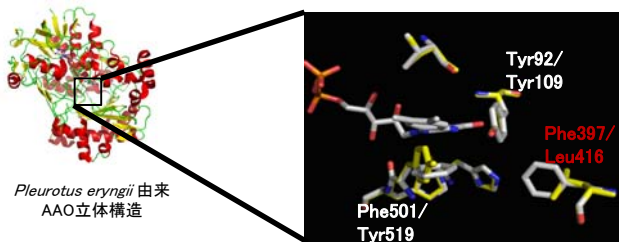


図2. PeAAOおよびCcAAO立体構造モデル

SDS-PAGE分析 UV/visスペクトル分析

データの掲載を差し控えて
させていただきます。

図3. 精製酵素SDS-PAGE

データの掲載を差し控えて
させていただきます。

図4. 野生型酵素UV/visスペクトル

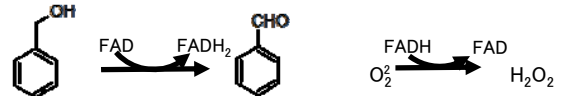
データの掲載を差し控えて
させていただきます。

図5. 野生型および変異型酵素UV/visスペクトル

総括

- CcAAOはPeAAOと異なる基質特異性を有していた。
- 疎水性チャネル付近のアミノ酸残基の官能基の大きさが触媒効率に影響を与えた。
- 上記の影響は芳香環を含む基質でより大きかった。

AAO触媒反応機構



FAD: フラビンアデニンジヌクレオチド

基質探索

表1. 各基質に対する野生型CcAAO酵素 H_2O_2 生成速度相対値

基質名	CcAAO (%)	PeAAO (%) ⁽¹⁾
Benzyl alcohol		100
<i>o</i> -Anisyl alcohol		< 5.0
<i>m</i> -Anisyl alcohol		100
<i>p</i> -Anisyl alcohol		571.4
2,4-Dimethoxybenzyl alcohol		177.5
Veratryl alcohol		326.1
3-Hydroxybenzyl alcohol		< 5.0
4-Hydroxybenzyl alcohol		< 5.0
Isovanillyl alcohol		319.1
Vanillyl alcohol		< 5.0
Cinnamyl alcohol		451.1
<i>trans, trans</i> -2,4-Hexadien-1-ol		531

参考文献: (1) Guillen et al., (1992) Eur. J. Biochem. 209, 603-611

酵素学的機能解析

表2. 各基質に対する野生型および変異型酵素の定常状態酵素反応速度定数

基質名	WT	k_{cat}/K_m (%)	PeAAO ⁽²⁾ k_{cat}/K_m (%)
<i>trans, trans</i> -2,4-Hexadien-1-ol	WT	61.3	2704.2
	L416F	82.7	
	L416W	48.7	
Benzyl alcohol	WT	100	100
	L416F	20.1	
	L416W	13.2	
<i>m</i> -Anisyl alcohol	WT	38.3	138.29
	L416F	7.1	
	L416W	7.3	
<i>p</i> -Anisyl alcohol	WT	21.4	11134
	L416F	14.6	
	L416W	9.1	
3-Hydroxybenzyl alcohol	WT	34.5	
	L416F	0.5	
	L416W	0.1	
4-Hydroxybenzyl alcohol	WT	1.7	
	L416F	1.1	
	L416W	0	
Veratryl alcohol	WT	5.4	446.8
	L416F	0.6	
	L416W	0.1	
Isovanillyl alcohol	WT	3.3	
	L416F	0.5	
	L416W	0.3	
Vanillyl alcohol	WT	46.4	323.4
	L416F	0.4	
	L416W	0	

参考文献: (2) Ferreira et al., (2010) Biochem J. 425, 585-593

本研究は科研費補助金基盤研究B(15H04526)のサポートにより実施された結果を含みます。