

## 銅のホメオスタシスに関与するマルチ銅オキシダーゼ CueO の構造と機能

櫻井 武・片岡 邦重

金沢大学大学院自然科学研究科物質科学専攻

### Structure and Function of CueO, a Multicopper Oxidase Concerned in Homeostasis of Copper

Takeshi Sakurai and Kunishige Kataoka

Division of Material Sciences, Graduate School of Natural Science and Technology,  
Kanazawa University

#### Abstract

CueO is a multicopper oxidase involved in Cu-homeostasis of *E. coli*. CueO has the four catalytic copper binding sites, a type 1 Cu, a type 2 Cu and a pair of type 3 Cu's, in a single chain protein molecule consisting of 484 amino acids. CueO has the fifth Cu-binding site constructed by Met355, Asp360, Met439, Met439 as the substrate-binding site, which is isolated from bulk waters by the Met-rich segment comprised of amino acids 355-400. The high cuprous oxidase activity of CueO is realized by the presence of this fifth Cu-binding site as revealed by the  $K_m$  value and the point mutations for the ligating amino acids. CueO showed enhanced oxidizing activities for organic substrates in the presence of Cu(II) ion at the fifth Cu-binding site because this extra Cu(II) ion functioned as the mediator of electron-transfer between exogenous substrate and type 1 Cu. Further, mutations at Asp112 adjacent to the trinuclear Cu center formed by type 2 Cu and type 3 Cu's indicated that this acidic amino acid functioned not only as a proton donor for dioxygen but also as a modulator for the binding of dioxygen.

**Keywords :** Cu-homeostasis, CueO, multicopper oxidase, four-electron reduction of dioxygen, point mutation

#### 1. はじめに

嫌気的な状態では銅は水に不溶な Cu(I)として存在するので、銅が生命によって利用され始めたのは、シアノバクテリアが酸素分子を生産するようになった数十億年前以降のことであると考えられている。酸素は当初、水に溶解している Fe(II)の酸化に使われたので、地球環境の酸素濃度が上昇し、硫化物として自然界に存在する銅

が水に溶解し生命によって広く利用されるようになったのは、生命の歴史においてはかなり後のことである。Cu(II)/Cu(I)の酸化還元電位は Fe(III)/Fe(II)の酸化還元電位よりも高く、大部分の銅タンパク質は 0.2-0.8V で機能することから、様々の基質の酸化に有効である。銅タンパク質での銅イオンの主たる役割は電子伝達と酸素の結合・活性化であり、呼吸、金属イオン(Fe, Cu, Mn)の輸送、酸化ストレスからの防御、物質代謝、血液凝固、色素形成などに関係している<sup>1,2)</sup>。銅は酸化還元活性であり、スーパーオキシドやその他の活性酸素の発生源となり、高い毒性を示すことから、銅のホメオスタシスを維持することは好気的な代謝にとって極めて重要である。すなわち細胞内の銅濃度は一定の狭い範囲に維持されている必要がある。銅ホメオスタシスの乱れは、アルツハイマー病、嚢胞性線維症、パーキンソン氏病の原因とも考えられている<sup>3,4)</sup>。

連絡先：櫻井 武

〒920-1192 金沢市角間町  
 金沢大学大学院自然科学研究科物質科学専攻  
 TEL : 076-264-5685  
 FAX: 076-264-5742  
 E-mail : ts0513@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

論文受付日：平成 18 年 8 月 3 日

論文受理日：平成 18 年 8 月 22 日

銅のホメオスタシスに関わる研究は *E. coli* や

**Table 1** Copper-homeostasis systems of *E. coli*

Homeostasis system	Regulation system	Function
CopA	CueR, CpxR	Detoxification of cytoplasmic Cu(I)
CusCFBA	CusRS	Detoxification of periplasmic and possibly cytoplasmic Cu(I)
CueO	CueR	Protection of periplasmic Cu-proteins
PcoABCD	PcoRS	Protection from periplasmic Cu stress
PcoE	CusRS(PcoRS)	Cu-binding(chaperone)

**Table 2** Specific activities of CueO

Substrate(mM)	Activity (U/mg)	
	without Cu(II)	with 1 mM Cu(II)
Cu(I) (0.1)	187	201
Fe(II) (0.5)	0.91	53
PD (5.0)	0.53	19
ABTS (3.0)	0.45	16
DMP (10.0)	0	29
Catechol (3.0)	0	12
Guaiacol (10.0)	0	0
Syringaldazine (0.01)	0	0

Cu(I): tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphate

Fe(II): hexacyanoferrate(II)

PD: *p*-phenylenediamine

DMP: 2,6-dimethoxyphenol

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

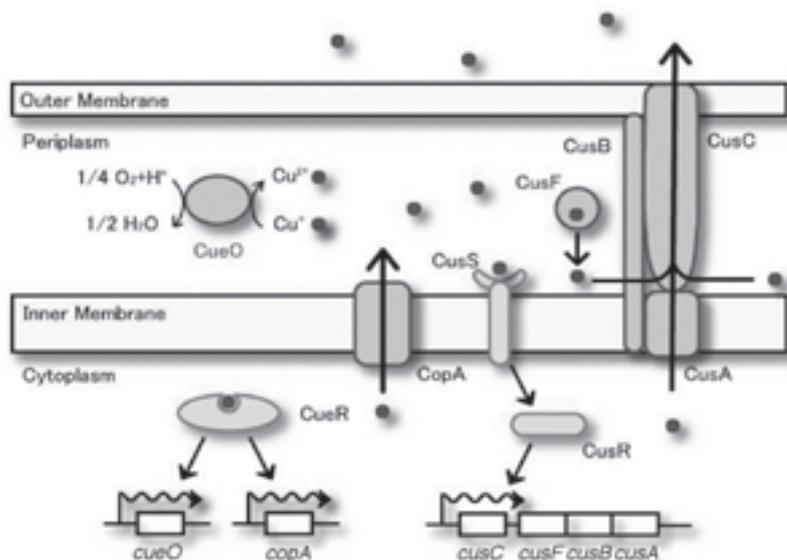
*Enterococcus hirae* で比較的良好に研究されている<sup>5)</sup>。 *E. coli* は通性嫌気性で温血動物の消化器官に生息することから銅耐性機構が発達していると考えられ、銅ホメオスタシスの研究に適している。 *E. coli* の銅に反応するシステムとして、センサーとレギュレーターが対となった CusRS によって制御される CusCFBA や MerR に類似した CueR によって制御される CueO などが発見されている (Table 1)<sup>6)</sup>。本稿では CueO についての最新の知見を、拙者らの研究結果を含めて概説する。なお、CueR は *cueO* (以前は *yacK* と呼ばれた)ばかりでなく *copA* 遺伝子も制御している。CopA はサイトプラズムからペリプラズムへ Cu を Cu(I)として輸送する P-タイプ ATPase であり、CueO はペリプラズムにおいて Cu(I)をより毒性の低い Cu(II)へと酸化する。 *cue* は Cu efflux の略であり、銅の排出系であることを表している (Fig.1)。

CueO は Cu(I)酸化活性が際立って高く、現在知られ

ている唯一の Cu(I)オキシダーゼである<sup>7)</sup>。また、Cu(I)酸化活性ほどは高くはないが、Fe(II)酸化活性も示すことから、セルロプラスミンや Fet3p<sup>8)</sup>と同様にフェロオキシダーゼでもある。さらに、エンテロバクチンやその前駆体のようなジフェノール類に対する酸化活性も有しており、ジフェノールによって Cu(II)が還元されることを阻害し、銅毒性を軽減していると考えられている<sup>9,10)</sup>。この反応は微生物のメラニン生成プロセスと類似している。

## 2. CueO の構造・性質

CueO はラッカーゼ様活性を示すマルチ銅オキシダーゼである<sup>11)</sup>。ただし、ラッカーゼ活性はあまり高くない。マルチ銅オキシダーゼとしては、植物由来のラッカーゼ<sup>12)</sup>、アスコルビン酸オキシダーゼ<sup>13)</sup>、脊椎動物の血液中に存在するセルロプラスミン<sup>14)</sup>がよく知られている。しかしながら、最近、微生物由来のマルチ銅オキシダーゼが数



**Fig. 1** Copper homeostasis mechanisms in *E. coli*. CueO is a multicopper oxidase to oxidize Cu(I) translocated by a P-type ATPase, CopA. CueR regulates transcriptions of CueO and CopA by sensing Cu ion. CusCFBA is a four-component Cu-efflux pump regulated by CusRS.

```

29 AERPTLPIPD LLTTDARNRI QLTIGAGQST FGGKTATTWG YNGNLLGPAV 78
                                     2 3
79 KLQRGKAVTV DIYNQLTEET TLHWHGLEVP GEVDGGPQGI IPPGGKRSVT 128
                                     3 3
129 LNVDQPAATC WFHPHQHGKT GRQVAMGLAG LVVIEDDEIL KLMLPKQWGI 178
179 DDVPVIVQDK KFSADGQIDY QLDVMTAAVG WFGDTLLTNG AIYPQHAAPR 228
229 GWLRLRLNNG CNARSLNFAT SDNRPLYVIA SDGGLLPEPV KVSELPVLMG 278
279 ERFEVLVEVN DNKPFDLVTL PVSQMGMAIA PFDKPHPVMR IQPIAISASG 328
329 ALPDTLSSLP ALPSLEGLTV RKLQLSMDPM LDMMGMQMLM EKYGDQAMAG 378
                                     V VI VII
379 MDHSQMMGHM GHGNMNHMH GGFDFPHHAN KINGQAFDMN KPMFAAAKGQ 428
                                     VII
429 YERWVISGVG DMMLHPFHIH GTQFRILSEN GKPPAAHRAG WKDVTVKVEGN 478
                                     1 2 3
489 VSEVLVKFNH DAPKEHAYMA HCHLLEHEDT GMLLGFTVGH HHHHH 517
                                     313 1 1

```

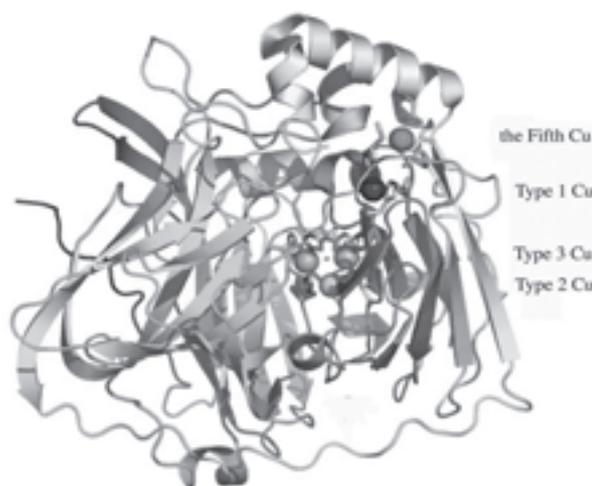
**Fig. 2** Amino acid sequence of the recombinant CueO. The peptide, GHHHHHH is attached to the C-terminal end for facile purification. Numbers indicate ligand amino acids for each type of copper. Amino acids 355-400 are the segment covering the substrate-binding site. Helices V, VI and VII are indicated by cylinders.

多く発見されており、バクテリアのマルチ銅オキシダーゼは抗生物質の生合成<sup>15)</sup>、胞子形成<sup>16)</sup>、金属耐性、形態形成、鉄<sup>17,18)</sup>やマンガン<sup>19)</sup>の酸化・輸送など<sup>20)</sup>に関与することが明らかにされている。このような状況の下、CueOは銅耐性に関わる酵素として発見された。

マルチ銅オキシダーゼの定義は、分光学的および磁気的性質の異なる Cu イオンが含まれることであり、通常、マルチ銅オキシダーゼはタイプ1、タイプ2、タイプ3銅を含んでいる。タイプ1、2銅を含む銅型亜硝酸還元酵素も広義にマルチ銅オキシダーゼに含められるが、銅

CueO	99	TLIHWGL	112	DG	141	HPHCHGK	443	HPFHHTGT	497	MAHCHLELEDTGM
BO	92	SVLEHGS	105	DG	132	WYHDHAM	398	HPFHHLV	454	MFECHNLIEDHDM
AO	58	VLEHWGV	73	DG	102	FYHGHLG	445	HPWELHGH	504	AFHCHIEPFLHMGG
RvLc	57	TLEHWGV	73	DG	102	WYHNSD	433	HPMELHGF	493	FLHCHFERHTTEGFA
AbLc1	61	SLEHWGF	98	DG	106	WYHSHLS	398	HPFELFGH	449	FLHCHIDWLEAGLA
TvLc1	62	SLEHWGF	77	DG	107	WYHSHLS	395	HPFELFGH	449	FLHCHIDFLEAGFA
CotA	103	VVELEGG	116	DG	151	WYHDHAM	419	HPFHHLV	489	VWECHILEHEDYDM
Fet3	79	SHHWGL	94	DG	124	WYHCHTD	413	HPFHHTGH	451	FYHCHIEWLLOGLG
PcoA	98	SLEHWGI	101	DG	142	WYHSHFG	542	HPFHLMGM	588	LLHCHLLYHMEGFE
HCp	98	TFHSHGI	101	DG	142	IYHSHID	542	HTVHFMGM	588	LLHCHVTDHIHAGFE

**Fig. 3** Homology of the partial amino acid sequences among CueO, *M. verrucaria* bilirubin oxidase (BO), ascorbate oxidase (AO), *R. vernicifera* laccase (RvLc), *A. thaliana* laccase (AbLc1), *T. versicolor* laccase (TvLc1), CotA, Fet3p, PcoA and human ceruloplasmin. Numbers indicate the amino acids coordinating each type of Cu site.



**Fig. 4** Crystal structure of CueO figured using PyMOL for the PDB data 1N68.

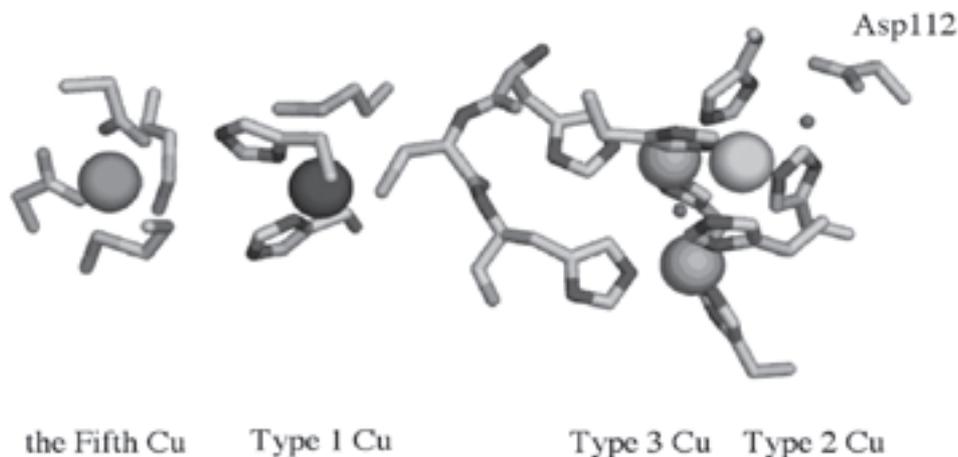
型亜硝酸還元酵素は構造的にはマルチ銅オキシダーゼの亜種に位置づけられる<sup>21)</sup>。CueO の有する銅イオンの構造や性質については後ほどふれることにして、まず、アミノ酸配列について眺めてみる。

Fig. 2 は CueO のアミノ酸配列を示している<sup>22)</sup>。cueO がコードするプレタンパク質のうち 1-28 番目の *N*-末端部分はシグナル配列であり、CueO は TAT 経路によりペリプラズムに移行する。このシグナル配列中にはリーダーペプチダーゼ開裂モチーフ (A<sub>16</sub>SA) が含まれている。成熟タンパク質は 29 番目の Ala に始まり、484 アミノ酸残基 (53.4 kDa) からなる。CueO は 3 つのクプレドキシ (ブルー銅タンパク質) 様のドメインから構成されている。マルチ銅オキシダーゼはクプレドキシをベースとして、2 ドメイン、6 ドメイン、3 ドメイン型の構造へと多様化してきたと考えられているが<sup>21)</sup>、CueO はアスコルビン酸オキシダーゼと同様に、3 ドメイン型のマルチ銅オキシダーゼである。Fig. 3 に他のマルチ銅オキシダーゼとの活性部位付近のアミノ酸配列の相同性を示した。C-末端付近に存在する配列 His-Cys-His はマルチ銅オキ

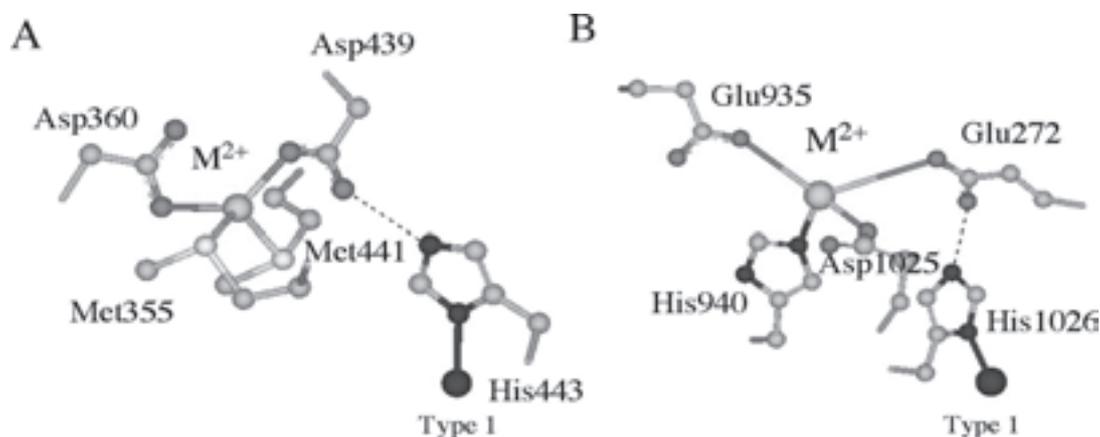
シダーゼに特有である。各タイプの銅への配位子となるアミノ酸と酸素の 4 電子還元におけるプロトンドナーと考えられる Asp112 は他のマルチ銅オキシダーゼでも極めて高く保存されている。

CueO はすでに結晶構造解析が行なわれており、PDB に座標データが登録されている (1KV7, 1N68, 1PF3)<sup>23,24)</sup>。Fig. 4 に全体構造を示す。また、Fig.5 には活性部位付近を拡大して示した。他のマルチ銅オキシダーゼと同様にタイプ 1 銅部位とタイプ 2 銅およびタイプ 3 銅からなる三核銅部位は約 13 Å 離れているが、分子内電子伝達経路を形成する配列 His-Cys-His によって直接結びつけられている。2 つのタイプ 3 銅は OH によって架橋されているが、Cu-O-Cu の角度は 170 であり、他のマルチ銅オキシダーゼの場合と比べて極端に直線状に近い (1KV7 の構造で架橋配位子は O 原子としているが、CuCl<sub>2</sub> をソーキングした 1N68 の構造では Cl が架橋しているとされている)。

CueO の構造上際立って特徴的であるのはドメイン 3 に位置する 355-400 のアミノ酸領域であり、基質の結合



**Fig. 5** The active center of CueO : the fifth Cu site, type 1 Cu site, type 3 Cu sites and type 2 Cu site from left to right.



**Fig. 6** Close-up of the substrate binding site of CueO (A) and ceruloplasmin (B), in which the acidic amino acid for the binding of the substrate metal ion and the histidine residue as a ligand for type 1 Cu are hydrogen-bonded. CueO and ceruloplasmin are figured using DS ViewerPro 5.0 for the PDB data 1N68 and 1KCW, respectively.

部位と考えられる第5の銅結合部位を覆う構造をとっている。このセグメントの構造はヘリックス5-ヘリックス6-ループ(構造がゆらいでいるため Fig. 4 では見えない)-ヘリックス7であり、45のアミノ酸残基中、14アミノ酸がMetである。Metに富む構造は CueOと同様に銅耐性に関与するPcoAやCopAでも見いだされている。第5の銅結合部位はMet355, Asp360, Met439, Met439から構成されており、ヘリックス5にも配位グループが存在している。銅タンパク質の銅結合部位を形成するアミノ酸としてはHisが最も一般的であり、他にCys, Met, Gln, Tyrも用いられるが、2Asp2Metという組み合わせは銅イオンを強く結合している必要のある銅タンパク質の触媒部位の配位子セットとしては見られないものである。この事実は、恒常的に強く銅イオンを結合するのではなく、解離することもまた重要という基質結合部位な

らではの条件を満たすものであると考えられる。Feイオンを基質として結合するセルロプラスミンとFet3pでは、それぞれ、2Glu1Asp1His<sup>25)</sup>, 1Glu2Asp1Gln<sup>8)</sup>が用いられており、この場合もまた、Feイオンとの適度な結合と解離を可能とする配位子が組み合わせられている。Mnオキシダーゼ活性を有するマルチ銅オキシダーゼの構造は現在のところ明らかではないが<sup>19)</sup>、置換活性な基質結合部位が形成されているものと予想される。Fig. 6にCueOとセルロプラスミンの基質結合部位を形成する酸性アミノ酸がタイプ1Cuに配位するHis残基と水素結合している様子を示した。この水素結合は基質からタイプ1Cuへの電子伝達経路となっているものと考えられる。類似したアーキテクチャーはラッカーゼ<sup>26)</sup>、Fet3p<sup>9)</sup>、アスコルビン酸オキシダーゼ<sup>27)</sup>においても見られることから、マルチ銅オキシダーゼの機能を担う普遍的な構造であると

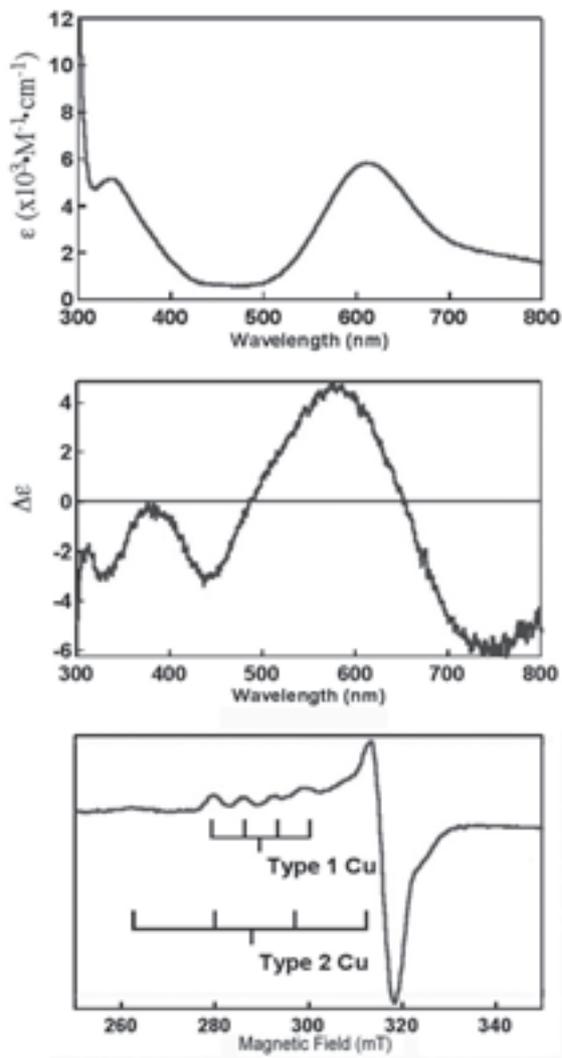


Fig. 7 Absorption, CD and ESR spectra of the recombinant CueO (from top to bottom).

想像される。

CueOの吸収、CD、およびESRスペクトルをFig. 7に掲げた。これらはC-末端に6xHis-tagを結合させた組換え体のスペクトルである。オーセンティック酵素はこれまで報告例がないが、最近、我々は偶然オーセンティック酵素を単離し、同じスペクトルを示すことを確認している<sup>28)</sup>。CueOはタイプ1銅を有するので鮮やかな青色を呈し、600nmに強い電荷移動帯を示す。また、三核銅部位に由来する330nmのOHからCu(II)への電荷移動帯は、他のマルチ銅オキシダーゼではショルダーとしてしか観測されないが、CueOの場合は明瞭にピークを与えている。OHは不整中心を有さないので、対応するCDバンドは通常極めて弱いのであるが、CueOによるこのバンドのCD強度は極めて強い。ESRスペクトルではタイプ1, 2銅が観測され、スピンハミルトニアンパラメータはそれぞれ、 $g_{II} = 2.24$ ,  $A_{II} = 6.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ ,  $g_{II} = 2.25$ ,  $A_{II} = 18 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ である。タイプ3銅はESR非検出で

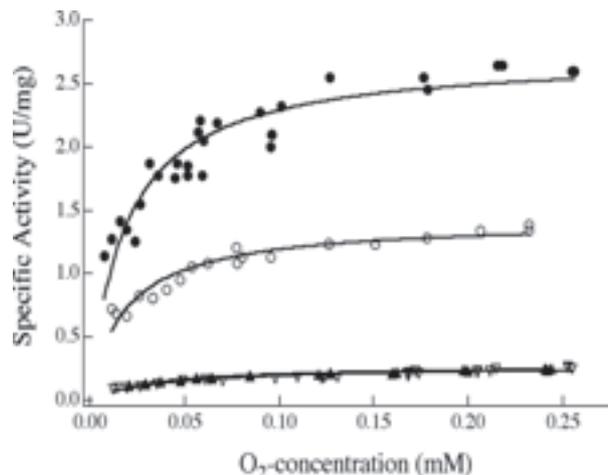


Fig. 8 Consumption of  $O_2$  by CueO (●), Asp112Asn (Δ), Asp112Ala (▽) and Asp112Glu (○) to determine the  $K_m$  values for the binding of  $O_2$  to the trinuclear Cu center.

ある。

### 3. CueOの機能

一般にマルチ銅オキシダーゼは有機化合物を基質とする。しかしながら、いずれのマルチ銅オキシダーゼも基質特異性はかなり広く、ヘキサシアノFe(II)イオンなどの無機化合物もまた酸化することができる。CueOはCu(I)に対する酸化活性が著しく高く、また、弱いながらFe(II)を酸化することができる。しかしながら、多くのマルチ銅オキシダーゼの基質となる2,2'-アジノ-ビス(エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、*p*-フェニレンジアミン(PD)などに対する酸化活性は極めて低い(Table 2)。さらに、代表的なラッカーゼ基質である2,6-ジメトキシフェノール(DMP)やカテコールに対しては全く酵素活性を示さない。このようにCueOがCu(I)オキシダーゼとして機能するのは、タイプ1銅部位の近傍に基質Cu(I)の結合部位が形成されているからであり、また、この部位を覆うセグメントはサイズの大きな有機化合物がタイプ1銅部位にアクセスすることを妨げている。このようにCu(I)結合部位がタンパク質によって覆われていることにより、近傍の誘電率は低下しているはずであり、このこともまたCu(I)やCu(II)の結合性に影響していると考えられる。

Table 2で示した様々の基質に対する反応は過剰のCu(II)イオンが存在すると状況がかなり変化する<sup>7,29)</sup>。すなわち、1mMのCu(II)存在下で、様々の基質に対する反応を調べると、Cu(I)の酸化活性は若干上昇するだけであるが、Fe(II)、ABTS、PDに対する活性は、20~60倍程度上昇している。また、酵素活性を示さなかったDMPやカテコールに対する酸化活性が新たに発現していた。この事実は、基質結合部位にCu(II)が存在すると基質と

タイプ1銅間の電子移動メディエーターとして機能している可能性を示唆するものである。酵素反応の生成物がこのような機能を発現する例はこれまで知られておらず、CueOはその分子構造のみならず、機能においても新規性に満ちた酵素であるということが出来る。Cu(II)の結合に対する $K_m$ 値(0.13 mM)はFe(II)に対するそれ(105 mM)よりも遥かに小さく、ここでもCueOがCu(I)オキシダーゼであることが裏づけられる。

次いで、Met355, Asp360, Met439, Met439によって構成される仮想的な基質結合部位が実際に機能しているか検証するために、Met355とAsp360をAlaに変異させたところ、1 mMのCu(II)存在下でも有機基質に対する活性増加は20~60倍ではなく、3倍程度にとどまった<sup>30)</sup>。この事実は、第5のCu結合部位の存在の証拠とその機能を証拠立てるものである。

次にCueOの機能を明らかにするために酸素の4電子還元部位の背面に位置するAsp112に着目した。このアミノ酸残基はタイプ3銅の一つに配位するHis448、タイプ2銅に配位するHis101と相互作用している。また、非配位H<sub>2</sub>Oを介して、タイプ2銅に配位するH<sub>2</sub>Oと水素結合ネットワークを形成している。このアミノ酸をGlu, Ala, Asnにポイントミューテーションした結果、Gluミュータントでは様々の基質に対する酵素活性は約半分に低下し、AlaやAsnミュータントでは酵素活性は5-15%程度に低下したことから、この位置には側鎖にカルボキシル基を有するアミノ酸が必須であることがわかった<sup>22)</sup>。また、分光学的な結果や各ミュータントのO<sub>2</sub>に対する親和性から、Asp112はO<sub>2</sub>が4電子還元される際にH<sup>+</sup>を供給するのをアシストするばかりでなく、O<sub>2</sub>の結合性もまたコントロールしていることが示された。

#### 4. 終わりに

Cu(I)オキシダーゼであるCueOに関する研究は緒に就いたばかりであるが、数々のユニークな局面を見せており、Fe(II)オキシダーゼであるセルロプラスミンやFet3pの構造・機能研究と補完的に、構造未知のMnオキシダーゼや今後発見されるであろう金属イオンオキシダーゼ研究のパイロット的研究となることが期待される。

また、既にプロテインエンジニアリングされたCueOをヘアカラーや生物燃料電池に利用する研究がスタートしており<sup>31)</sup>、CueOには極めてユニークなCu(I)オキシダーゼという枠を遥かに超えた多機能酵素としての将来が開けている。

#### 参考文献

- 1) Finney L A, O'Halloran T V : Transition metal speciation in the cell : Insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300 : 931-936 (2003).
- 2) Rensing C, Grass G : *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 : 197-213 (2003).
- 3) Torsdottir J, Kristinsson S, Sveinbjornsdottir J, Snaedal J, Johannesson T : Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol. Toxicol.* 85 : 239-243 (1999).
- 4) Requena J R, Groth D, Legname G, Stadtman E R, Prusiner B, Levine R L : Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa (29-231) prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 7170-7075 (2001).
- 5) Solioz M, Stoyanov J V : Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 : 183-195 (2003).
- 6) Outten F W, Huffman D L, Hale J A, O'Halloran T V : The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276 : 60671-30677 (2001).
- 7) Singh S K, Grass G, Rensing C, Monfort W R : Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186 : 7815-7817 (2004).
- 8) Taylor A B, Stoj C S, Ziegler L, Kosman D J, Hart P J : The copper-iron connection in biology : structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 : 15459-15464 (2005).
- 9) Grass G, Thakari K, Klebba P E, Thieme D, Muller A, Wildner G F, Rensing C : Linkage between catecholate siderophore and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186 : 5826-5833 (2004).
- 10) Kim C, Lorenz W W, Hoopes J T, Dean J F : Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli yak* gene. *J. Bacteriol.* 183 : 4866-4875 (2001).
- 11) Grass G, Rensing C : CueO is a multicopper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 : 902-908 (2001).
- 12) Nitta, K, Kataoka K, Sakurai T : Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidase. *J. Inorg. Biochem.* 91 : 125-131 (2002).
- 13) Huang H, Sakurai T, Monjushiro H, Takeda S : Magnetic studies of the trinuclear center in laccase and ascorbate oxidase approached by EPR spectroscopy and magnetic susceptibility measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1384 : 160-170 (1998).
- 14) Sakurai T, Nakahara : The effect of some anions

- on the spectral properties of bovine ceruloplasmin. *J. Inorg. Biochem.* 27 : 85-93 (1986).
- 15) Smith A W, Camara-Artigas A, Wang M, Allen A P, Francisco W A : Structure of phenoxazinone synthase from *Streptomyces antibioticus* reveals a new type 2 copper center. *Biochemistry* 45 : 4378-4387 (2006).
  - 16) Enguitta F, Martins L O, Henriques A O, Carrondo M A : Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* 278 : 19416-19425 (2003).
  - 17) Kwok E Y, Severance S, Kosman D J : Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane. *Biochemistry* 45 : 6317-6327 (2006).
  - 18) Griffiths, T A M, Mauk A G, MacGillivray R T A : Recombinant expression and functional characterization of human hephaestin : a multicopper oxidase with ferroxidase activity. *Biochemistry* 44, 14725-14731 (2005).
  - 19) Brouwers G-J, de Vrind J P M, Corstjens P L A M, Cornelis P, Baysse C, de Vrind-de Jong E W : *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1762-1768 (1999).
  - 20) Huffman D L, Huyett J, Outte F W, Doan P E, Finney L A, Hoffman B M, O'Halloran T V : Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential component of *Escherichia coli* *poc* copper resistance operon. *Biochemistry* 41 : 10046-10055 (2002).
  - 21) Nakamura K, Go N : Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 : 2050-2066 (2005).
  - 22) Ueki Y, Inoue M, Kurose S, Kataoka K, Sakurai T : Mutations at Asp112 adjacent to the trinuclear Cu center in CueO as the proton donor in the four-electron reduction of dioxygen. *FEBS Lett.* 580 : 4069-4072 (2006).
  - 23) Roberts S A, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazard J T, Tollin G, Rensing C, Montfort W R, Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 2766-2771 (2002).
  - 24) Roberts S A, Wildner G F, Grass G, Weichsel A, Ambrus A, Rensing C, Montfort W R : A labile regulatory copper iron lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J. Biol. Chem.* 278 : 31958-31963 (2003).
  - 25) Zaiseva I, Zaitsev V, Card G, Moshkov K, Bax B, Ralph A, Lindley P : The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å : nature of the copper centers. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1 : 15-23 (1996).
  - 26) Bertrand T, Jolivald C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Maddzak C, Mougin C : Crystal structure of a four-copper laccase complexes with an arylamine : insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41 : 7325-7333.
  - 27) Messerschmidt A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Petruzzelli R, Rossi A, Finazzi-Agro A : Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224 : 179-205 (1992).
  - 28) Sawai T, Kataoka K, Sakurai T : unpublished results.
  - 29) Kataoka K, Ueki Y, Konno Y, Sakurai T : Submitted.
  - 30) Kataoka K, Ueki Y, Sakurai T : Manuscript in preparation.
  - 31) Japan Patent 2005-274545, 349296.