〔総説〕 松本歯学 32：11～20，2006
key words：metalloprotease — catalytic domain — dipeptidyl peptidase

金属プロテアーゼの活性部位の構造：新奇な酵素活性部位を持つジペプチジルペプチダーゼⅢを中心に

深澤加與子

松本歯科大学　大学院　硬組織疾患制御再建学講座

Structure of catalytic domain of metalloprotease : mainly considering the novel motif identified on DPPⅢ

KAYOKO M FUKASAWA

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto Dental University

Summary

Almost metalloproteases contain a zinc atom in the active domain coordinating three amino acid residues on the protein and a single water molecule. Metalloproteases are classified into several groups according to the amino acid sequence of the catalytic domain. Dipeptidyl peptidase (DPP)Ⅲ, which catalyzes the removal of unsubstituted, N-terminal dipeptide from peptides and β-naphthylamide derivatives, had been classified as a serine protease until the amino acid sequence of DPPⅢ was determined. The presence of a similar HELLGH motif on DPPⅢ as the zinc metalloprotease motif HEXXH raises the possibility that DPPⅢ is a metalloprotease. By electrothermal atomic absorption spectrometry, DPPⅢ was demonstrated to contain one mol of zinc per mol of protein, and on zinc-binding study, the dissociation constant (K_d) of DPPⅢ was detected to be $(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-13}$ M. These findings show that DPPⅢ is a mono zinc metalloprotease. Furthermore, mutagenesis experiments confirmed that residues His^{450}, His^{455} and Glu^{451} on DPPⅢ are involved in zinc coordination and catalytic activity, and that residue Glu^{508} is a third ligand of zinc atom. DPPⅢ has been newly classified as a metalloprotease containing a novel zinc-binding domain “HELLGH motif”. The three-dimensional structure of the catalytic domain and putative catalytic mechanism of DPPⅢ are deduced from that of thermolysin proposed by Matthews along with these site-directed mutagenesis studies on DPPⅢ.

(2006年4月10日受理)

はじめに

ワトソンとクリックのDNA二重らせん構造の発見は，今日の急速な分子生物学の進展をもたらし，多くの研究分野に影響を与えた．そのなかでも生体高分子，特にタンパク質の一次構造決定は，数十年前は，純度の高いタンパク質の精製ならびにPTH法によるアミノ酸配列の決定と，経験に基づく高度な技術力と膨大な時間を要した，しかしクローニング技術の導入により，タンパク質の入手が劇的に容易になり，飛躍的な伸びでタンパク質の一次構造が決定されてきた．それと同時に，X–線結晶解析や核磁気共鳴スペクトル分析機器類の進歩が伴い，タンパク質の高次構造が次々明らかにされ，生理機能解明へと続き，生体の神秘が解き明かされてきた．

タンパク質分解酵素は，生体内タンパク質の恒常性の保持，ホルモンレベルの調節などに関与するが，いまだ多くの酵素でその標的は不明である．2004年に出版されたHand Book of Proteolytic Enzymes 第2版[1]には662種の酵素が掲載され，その触媒作用に関与するアミノ酸残基に基づき，アスパラギン酸酵素，セリンとスレオニン酵素，システイン酵素ならびに金属酵素に分類されている．

本総説では，セリン酵素に分類されていたジペプチジルペプチダーゼ（DPP）Ⅲが新奇な活性中心構造を持つ金属酵素であることが証明される過程を述べ，最も多種類の酵素が同定されている金属プロテアーゼの活性中心構造について総括し，タンパク質の構造決定法ならびにその意義について考察する．

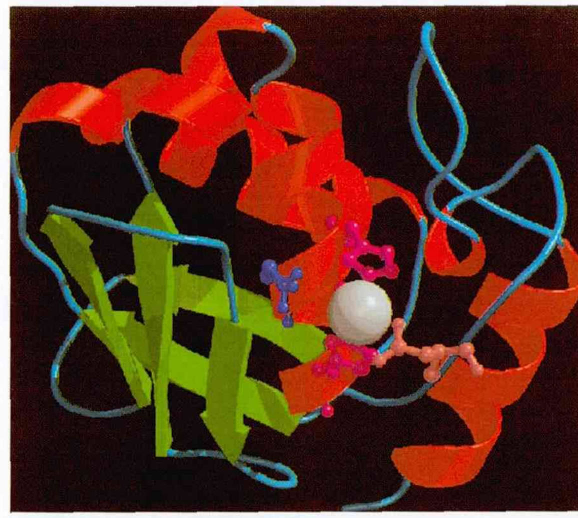

図１：Richardson diagram of snapalysin. The image was prepared from the Brookhaven Protein Data Bank entry (1 KUH[9]). The zinc ion is shown as a dark gray sphere. The zinc ligands are shown in ball–and–stick：His^{92} (red), His^{96} (red) and Asp^{102} (pink). The catalytic Glu^{94} is also shown in ball–and–stick (blue).

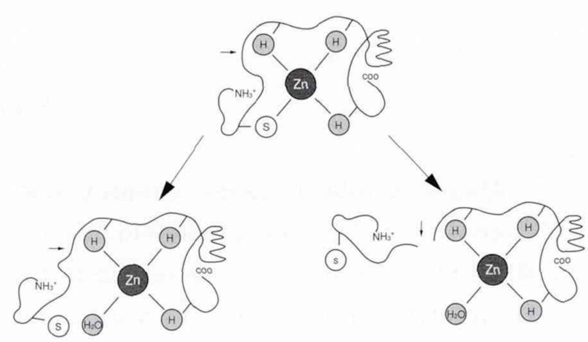

図２：Schematic of the mechanism for the activation of the matrix prometalloproteinase. Activation occurs through the conversion of the zinc coordinated to four amino acid residues (tetradentate) into one that is coordinated to only three residues (tridentate) through the removal of one ligand, cysteine, S, which is then replaced by water. The small arrow indicates the peptide region of the presumable autocatalytic cleavage site. Histidine residue is shown H.

金属プロテアーゼの活性中心構造

金属プロテアーゼには，コバルトイオンあるいはマンガンイオンを含むものが有る，しかし大多数の金属酵素が活性中心に亜鉛イオン１原子を含んでいる．サーモライシン[2]，カルボキシペプチダーゼA，B[3,4]，などのプロテアーゼやその他β–ラクタマーゼ[5]，ホスホリパーゼC[6]，アルカリホスファターゼ[7]などの亜鉛酵素のX–線結晶解析により，窒素原子（ヒスチジン），酸素原子（グルタミン酸）あるいはイオウ原子（システイン）のいずれか３～４個の原子が亜鉛イオンと配位結合していることが示された[8]．Metzincinに属するSnapalysinの亜鉛結合部位の構造イメージ像（図１）[9]とプロコラゲナーゼの活性化機構の予想模式図（図２）に示すように[8,10]．プロコラゲナーゼは，亜鉛イオンが３個の窒素原子と１個のイオウ原子の４原子と配位結合している，これがシステインを含むN末端ペプチドが分解あるいは変性することによりイオウの配位がはずれ，水分子が第４の配位子として結合し，活性酵素となる．

これまでに一次構造が明らかにされてきた多く

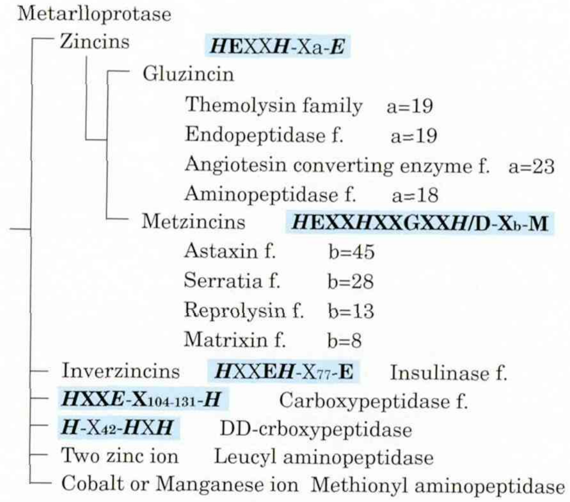

図３：Families of metalloproteases.

のデータを相同検索することで，その活性中心構造の推測や不明な生理活性を予測するようになってきた．1990年代には，金属結合部位と予想されるアミノ酸配列に基づいて金属プロテアーゼは分類されてきた[11,12,13]．Hooper[11]の亜鉛メタロプロテアーゼの分類を修正し図３に示す．現在金属プロテアーゼとして登録されているうちの65％はHEXXHモチーフを持つZincinに属している．ZincinはGluzincinとMetzincinに分けられ，アミノペプチダーゼ類が属しているGluzincinは２個のヒスチジン残基ならびにC–末端側に18～58残基離れたグルタミン酸残基に亜鉛イオンが配位している．マトリックスメタロプロテアーゼ類が属しているMetzincinは３個のヒスチジン残基（あるいは１個のヒスチジンがアスパラギン酸と置き換わっている）を含むHEXXHXXGXXH/Dモチーフが保存されている．その他，Zincin同様，１個の亜鉛イオンを持つ，Inverzincinやカルボキシペプチダーゼファミリーなどのモノジンク酵素，２個の亜鉛イオンを含むもの，コバルトイオンやマグネシウムイオンを含むものなどに分類される．

ジペプチジルペプチダーゼⅢ

ジペプチジルペプチダーゼ（DPP）Ⅲはペプチドのアミノ末端からジペプチドを分離分解するエキソペプチダーゼのひとつで，1967年ウシ脳下垂体前葉[14]から分離精製されて以来，ラット，ヒトやブタなどの皮膚，脳，胎盤，赤血球，眼球や膵臓など多くの組織から分離されその酵素化学的性質が明らかにされてきた[15–17]．生理活性ペプチドを分解することからエンケファリナーゼ[18]あるいは，アンジオテンシナーゼ[19]とも呼ばれている．しかし阻害実験では金属酵素，システイン酵素ならびにセリン酵素の阻害剤すべてに影響を受ける（表１）ことから活性中心のアミノ酸は未定であったが，1992年にIUBMBの酵素命名部門でセリン酵素に分類され，また1998年に発行されたHandbook of Proteolitic Enzymesの初版でもセリン酵素として掲載された．

DPPⅢの一次構造の決定と金属酵素の証明

我々は，DPPⅢがセリン酵素であることに疑問を持ち，この酵素のクローニングを試みた．まず活性の高いヒト胎盤から酵素を単一に精製し，抗体を作成した．ラット肝臓から作成したcDNA

表１：Effect of inhibitors on enzyme activity

Data indicate concentration for 50 % inhibition of placental DPPⅢ.
PCMPS, p–chloromercuriphenylsulphonic acid ; NEM, N–ethylmaleimide ; DCl, 3,4–dichloroisocoumarin ; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride

Enzyme activity	Potential inhibitor	Inhibitor concentration of 50% inhibition (μM)
Metallopeptidase	o–Phenanthroline	240±16
	EDTA	298±11
Cysteine peptidase	PCMPS	3.30±0.24
	NEM	6330±640
Serine peptidase	DCl	4.54±0.74
	PMSF	2170±470

ctgcagcagggctc -14

ATGGCAGATACCCAGTACATCCTGCCCAATGACATCGGTGTGTCTAGCCTGGACTGCCGGGAGGCATTCCGCCTGCTGTCACCCACAGAG 90
M A D T Q Y I L P N D I G V S S L D C R E A F R L L S P T E 30

CGCCTCTATGCCCATCACCTGTCTAGAGCCGCTTGGTATGGAGGCCTGGCTGTGCTGCTCCAGACATCTCCTGAAGCCCCCTACATCTAT 180
R L Y A H H L S R A A W Y G G L A V L L Q T S P E A P Y I Y 60

GCCCTGCTTAGCCGCCTCTTCCGTGCCCAGGACCCTGACCAGCTACGCCAACATGCCCTGGCTGAGGGCCTGACTGAAGAAGAGTATCAG 270
A L L S R L F R A Q D P D Q L R Q H A L A E G L T E E E Y Q 90

GCATTCCTGGTCTACGCTGCAGGGGTCTACTCCAACATGGGCAACTATAAGTCCTTCGGTGACACCAAGTTTGTCCCTAACCTGCCCAAG 360
A F L V Y A A G V Y S N M G N Y K S F G D T K F V P N L P K 120

GAAAAGCTGGAGCGTGTGATCCTTGGGAGTAAGGCTGCCCAACAGCATCCAGAAGAAGTCAGGAGCCTTTGGCAGACCTGTGGGGAGCTT 450
E K L E R V I L G S K A A Q Q H P E E V R S L W Q T C G E L 150

ATGTTCTCCCTGGAACCAAGGCTTCGACATCTTGGGCTGGGGAAGGAGGGAGTCACCACCTATTTCTCTGGGGATTGTGCCATGGAAGAT 540
M F S L E P R L R H L G L G K E G V T T Y F S G D C A M E D 180

GCCAAGCTGGCCCAGGACTTCCTGGACTCTCAGAACCTCAGTGCATACAACACCCGGCTCTTCAAGGTGGTCGGCCAGGAAGGGAAGTAC 630
A K L A Q D F L D S Q N L S A Y N T R L F K V V G Q E G K Y 210

CACTATGAGGTGCGACTGGCTTCAGTACTCAACACAGAACCTGCTCTCGACTCTGAGTTGACTTCCAAGCTGAAGAGCTACGAGTTCCAG 720
H Y E V R L A S V L N T E P A L D S E L T S K L K S Y E F Q 240

GGGAATCATTTCCAGGTCACCCGTGGGGACTATGCCCCCATCCTCCAGAAGGTGGTAGAACACTTGGAGAAAGCTAAGGCTTATGCAGCC 810
G N H F Q V T R G D Y A P I L Q K V V E H L E K A K A Y A A 270

AATAGCCACCAGGAGCAAATGCTGGCCCAGTATGTGGAGAGCTTCACCCAGGGTTCCATTGAGGCCCATAAGAGGGGCTCCCGCTTCTGG 900
N S H Q E Q M L A Q Y V E S F T Q G S I E A H K R G S R F W 300

ATTCAGGACAAAGGTCCCATTGTAGAGAGTTACATTGGCTTCATTGAGAGCTACCGTGACCCCTTTGGCTCCCGAGGAGAATTTGAAGGC 990
I Q D K G P I V E S Y I G F I E S Y R D P F G S R G E F E G 330

TTCGTGGCCATGGTAAACAAAGACATGAGTGCAAAGTTCGAGCGGCTGGTTGCAAGTGCTGAGCAGCTGCTGAAGGAGCTGCCTTGGCCT 1080
F V A M V N K D M S A K F E R L V A S A E Q L L K E L P W P 360

CCTGCCTTTGAGAAGGACAAGTTCCTCACCCCTGACTTCACTTCCCTGGATGTCCTTACCTTTGCCGGCTCTGGCATCCCTGCAGGCATC 1170
P A F E K D K F L T P D F T S L D V L T F A G S G I P A G I 390

AACATCCCCAACTATGATGACCTGAGACAGACAGAGGGCTTTAAGAATGTGTCTCTGGGGAATGTGCTGGCTGTGGCCTATGCCACAAAG 1260
N I P N Y D D L R Q T E G F K N V S L G N V L A V A Y A T K 420

CGGGAGAAACTCACCTTCATGGAGGAAGAAGACAAGGACCTGTACATCCGCTGGAAGGGGCCGTCCTTTGATGTGCAGGTGGGGTTACAT 1350
R E K L T F M E E E D K D L Y I R W K G P S F D V Q V G L H 450

GAGCTGTTGGGCCATGGCAGCGGCAAGCTCTTTGTACAGGATGAGAAAGGTGCTTTCAACTTTGACCAGGAGACAGTGATCAACCCAGAG 1440
E L L G H G S G K L F V Q D E K G A F N F D Q E T V I N P E 480

ACTGGGGAGCAGATCCAGAGCTGGTACCGGAGTGGAGAGACATGGGATAGCAAATTTAGCACCATTGCCTCCAGCTACGAAGAGTGCCGG 1530
T G E Q I Q S W Y R S G E T W D S K F S T I A S S Y E E C R 510

GCTGAGAGCGTGGGCCTCTACCTCTGTCTCAACCCCCAAGTACTTCAGATCTTTGGCTTTGAGGGAACTGACGCAGAAGATGTCATCTAT 1620
A E S V G L Y L C L N P Q V L Q I F G F E G T D A E D V I Y 540

GTGAACTGGCTCAACATGGTCCGGGCTGGGCTGTTGGCTTTGGAGTTCTACACCCCAGAGACGGCCAACTGGCGACAGGCCCACATGCAG 1710
V N W L N M V R A G L L A L E F Y T P E T A N W R Q A H M Q 570

GCCCGGTTTGTGATCCTGAGGGTTTTGCTGGAAGCTGGCGAAGGACTCGTTACCGTCACCCCCACCACAGGCTCTGATGGGCGCCCAGAT 1800
A R F V I L R V L L E A G E G L V T V T P T T G S D G R P D 600

GCTCGTGTCCACCTGGACCGCAGCAAGATCCGGTCAGTGGGCAAACCTGCTTTGGAGCGGTTCCTCCGGAGACTGCAGGTGCTGAAGTCC 1890
A R V H L D R S K I R S V G K P A L E R F L R R L Q V L K S 630

ACGGTATTGCTGCGCAAGGAATCCCGGAAGCTTATTGTCCAGCCCAACACTCGCCTGGAAGGCTCAGAAGTGCAACTTGTAGAGTATGAG 2070
T V L L R K E S R K L I V Q P N T R L E G S E V Q L V E Y E 690

GCCTCAGCGGCTGGTCTCATCCGATCCTTCTGTGAACGGTTTCCGGAGGATGGGCCTGAGTTGGAGGAGGTTCTTACCCAGCTGGCCACA 2160
A S A A G L I R S F C E R F P E D G P E L E E V L T Q L A T 720

GCAGATGCTCAATTCTGGAGGGATCAGGTCCAGGAGGCCCCATCTGGCCAGGCTTGAgaagatctgtgtggcatctcccctttcatcaaa 2250
A D A Q F W R D Q V Q E A P S G Q A

ccagggctgtctgtggccctgaattgtgtttaggaggtgggggaagggcaggagctcggactttggtgctacctcagctgagggtggtga 2340
tgctaaccccttccatttgtcagcactttccagtttaccattatgtcctcatttcctggatctgcactgccatctgtggtgggagctcaa 2430
cagggtgcctagtctggttttccaaatgggaaggtggcagttctgagaagtaactgttctagatccagcaggtggcatgtgacagagcca 2520
gggctcaaagcattctcaccaaatccagtgctcttcgtgtattaccttttatagccagaaa**aataaa**tatgacaaccaccaaaaaaaaaa 2610
aaaaaaaa 2618

図4：Nucleotide sequence of the cDNA and the deduced amino acid sequence of DPPⅢ. Nucleotide residues are numbered from 5' to 3', with the first residue of the ATG codon encoding the putative initiating methionine. The deduced amino acid sequence is displayed below the nucleotide sequence as a single-letter code starting from methionine. The sequences matching those of peptide fragments indicated after tryptic digestion of the recombinant DPPⅢ are underlined. The putative polyadenylation signal is indicated by boldface.

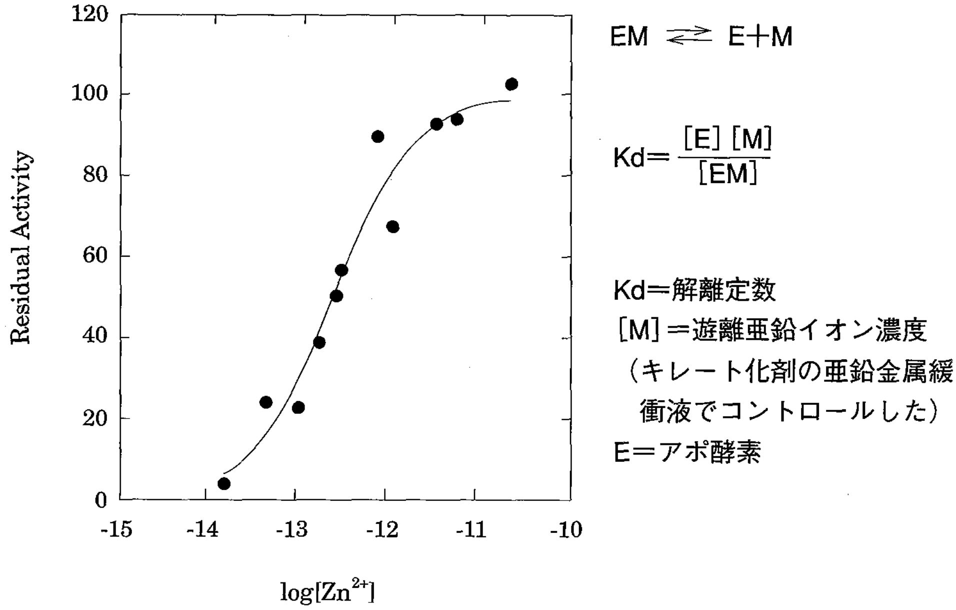

図５：Relationship between residual enzyme activity and log $[Zn^{2+}]$. The assays were conducted in 100 μl of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 900 μM~25 mM 2,6-pyridinedicarboxylate (-PA) and 100 μM $ZnSO_4$. After equilibration between apo-DPPⅢ and 2,6-PA for the Zn^{2+} ions (60 min incubation at 25℃), reactions for the enzyme activity were performed with the standard enzyme assay.

表２：Recombinant Dipeptidyl peptidase Ⅲ

cDNA	: 2653 bp
CDS	: 29–2242
	738 aminoacids
MW	: 83033
pI	: 4.94

ライブラリーから，イムノスクリニング法でDPPⅢクローンを分離した[20]．ラットDPPⅢcDNAの塩基配列ならびにタンパク質データを図４と表２に示す．推定アミノ酸配列は，精製酵素のエドマン法で決定した５個のペプチドと一致した．アミノ酸配列の相同検索では，酵母の塩基配列から推定した仮想タンパク質01232と40.4%と高い相同性を示したのみで，他に相同性を示すタンパク質は存在しなかった．しかしアミノ酸配列内にZincinと類似した“HELLGH”配列があることから，原子吸光法で亜鉛を測定した結果，タンパク質１分子に１原子の亜鉛が存在することが明らかになった．亜鉛イオンの触媒活性に対する作用を調べるため，亜鉛との解離定数（図５）を求めたところ，$K_d=2.5\times10^{-13}$Mで亜鉛イオンと非常に高い親和性を示した．一般的に金属酵素の解離定数は10^{-9}M以下になる，参考に他の金属酵素の解離定数を表３に示す．これらの結果からDPPⅢは亜鉛酵素であることが明らかになった．

DPPⅢの活性中心の決定

X-線結晶解析により，タンパク質の立体構造が明らかにされてきた，しかし生体内で同様の構造を取って生理活性を示すかどうかは不明で，変異実験での活性の変化によって証明される．Zincinと類似した“HELLGH”に注目して，NBRF-PIR protein sequence databaseを検索したところ，鉄酵素であるチロシン水酸化酵素，トリプトファン水酸化酵素ならびにフェニールアラニン水酸化酵素にまったく同一の配列が存在した．これにより“HELLGH”配列が金属配位モチーフの可能性が高いと推測し，点変異実験を行った[21]．ヒスチジンをチロシン（H 450 Y，H 455 Y）に，グルタミン酸をアラニンとアスパラギン酸（E 451 A，E 451 D）に置き換えた変異体遺伝子を含むプラスミド感染菌を培養し，DPPⅢ活性を測定した．図６に示すように，HELLGHモチーフ内の置換体H 450 Y，H 455 Y，E 451 AならびにE 451 Dは全く活性を失った．一方，このモチーフのC-末端側に，N-末端から474番目のグルタミン酸変異体（E 474 A，E 474 D）は，野性型に対して140%の活性を示したのに対し，他の３グルタミン酸残基の変異体（E 493 A，E 493

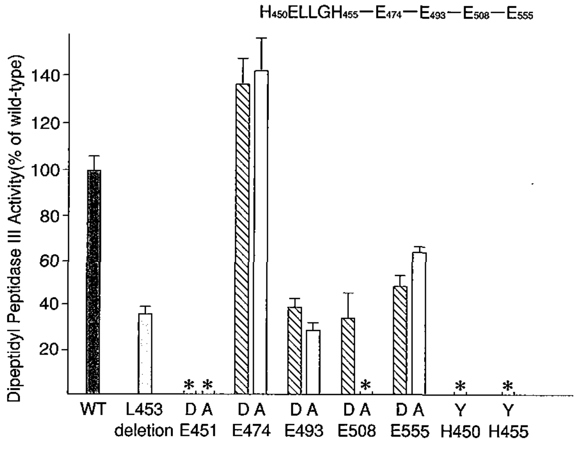

図6：Enzyme activity of rat DPPⅢ mutants in the cell suspensions. DPPⅢ activity in suspensions of transfected *E.coli* cells is expressed as a percentage of the wild-type DPPⅢ activity. Measurements are the mean of four or five independent cultures. The means value for wild-type DPPⅢ corresponds to 72.3 nmol/min・/mg of protein. The asterisks mean not detectable.

D，E 508 A，E 508 D，E 555 A ならびに E 555 D）は活性の低下を示し，特に508番目のグルタミン酸をアラニンに置き換えた変異体（E 508 A）はまったく活性を示さなかった．これらの変異体の酵素活性の変化に基づき HELLGH モチーフ内の2個のヒスチジンとグルタミン酸ならびに508番目のグルタミン酸が活性に直接関与するものと考え，これらの変異酵素を単一に精製し分析した結果を表4に示す．450番目と455番目のヒスチジンのチロシンへの置換は活性も亜鉛イオンも共に失うのに対し，451番目グルタミン酸のアラニンとアスパラギン酸への置換は，亜鉛イオンをタンパク質1分子に対し1原子保持しているにもかかわらず，完全に失活した．この結果はモチーフ内の二つのヒスチジンが亜鉛イオンに配位し，グルタミン酸は触媒作用に関与することを示した．アミノペプチダーゼファミリーの場合（ApA[22] or ApB[23,24]），亜鉛の第3の配位子は，zincin モチーフから19残基 C-末端側のグルタミン酸であるが，DPPⅢでは，同位置のグルタミン酸のアラニン（E 474 A）ならびにアスパラギン酸（E 474 D）への置換酵素は，共に野性型酵素とほぼ同様の酵素化学的性質示したのに対し，HELLGH モチーフから53残基 C-末端側のグルタミン酸（Glu[508]）のアラニンへの置換酵素（E 508 A）は，亜鉛イオンならびに DPPⅢ活性共失った．この結果から第3の配位アミノ酸は HELLGH モチーフから53残基 C-末端側グルタミン酸（Glu[508]）であることが明らかになった．

DPPⅢの活性中心の立体構造予測

1997年，Goodwill らは，チロシン水酸化酵素のX-線結晶解析を行い，HELLGH モチーフが鉄イオンと配位していることを報告した[25]．図7は DPPⅢ，チロシン水酸化酵素ならびにサーモライシンの活性部位のアミノ酸配列（A）とX-線結晶解析のデータから計算されたサーモライシン[26]とチロシン水酸化酵素の金属結合部位を重ね合わせた構造予想図（B）である．チロシン水酸化酵素は2つの配位アミノ酸であるヒスチジンの間にサーモライシンより1分子多い3個のアミノ酸が存在しているにもかかわらず，亜鉛と鉄イオンの距離は非常に近く1.14 Åで，配位角度はそれぞれ100度と88度になり類似の原子配置をとることが予想された．また DPPⅢの HELLGH モチーフ内のアミノ酸をひとつ削除し zincin と同じ配列にした L^{453}-deletion 変異体は表4に示す様に，二次反応速度（k_{cat}/k_m）の値が5分の1と少し減少した以外は野性型酵素とほぼ同じ酵素化学的性質を示し，X-線結晶解析の分析を支持する結果となり，DPPⅢはサーモライシンと類似の活性中心構造をとるものと考えられた．さらに

表3：Zinc dissociation constant in several metalloenzymes

Enzyme name	K_d (M)	co-ordination residues
Carboxypeptidase A[42] (bovine)	3×10^{-11}	His, His and Glu
Carbonic anhydrase[43] (bovine)	3×10^{-12}	His,His and His
Yeast aminopeptidase I [44]	2.8×10^{-8}	Asp, Asp, Asp, Glu and His

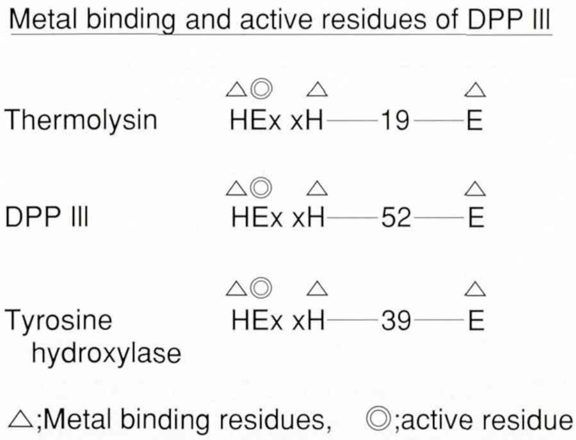

図 7 **A**

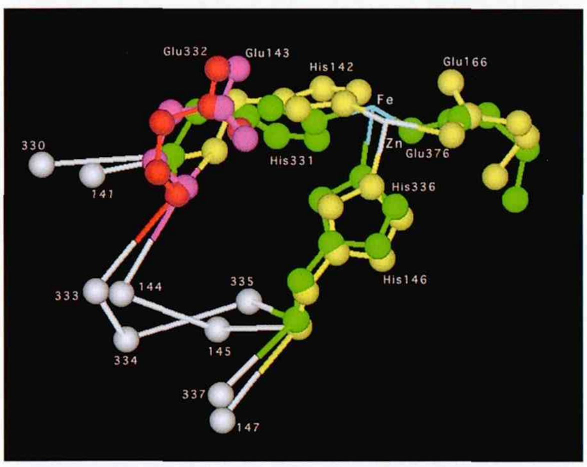

図 7 **B**：Superposition of the zinc binding residues in thermolysin onto the active site in tyrosine hydroxylase. In thermolysin, the yellow residues are His[142], His[146], and Glu[166] and the pink residue is Glu[143]. In tyrosine hydroxylase, the green residues are His[331], His[336] and Glu[376] and red residue is Glu[332]. This figure was generated from PDB files 1 HYT[26] and 1 TOH[25]

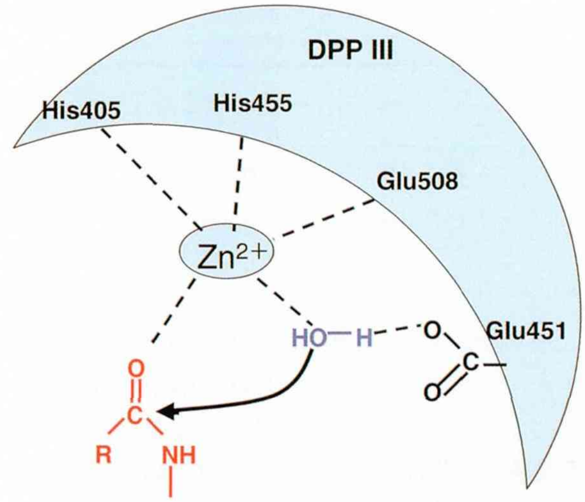

図 8：The putative catalytic mechanism of DPPⅢ deduced from that of thermolysin proposed by Matthews[45] and the site-directed mutagenesis studies on DPP Ⅲ. Substrate and water molecules are shown in red and blue, respectively.

DPPⅢの亜鉛イオンを他の二価イオンのコバルトならびに銅イオンに置換して行った電子スピン共鳴スペクトル分析の結果[27,28]は，カルボキシペプチダーゼA[29,30]ならびにサーモライシンと同様，金属イオンと配位しているヒスチジン（N）2個，グルタミン酸（O）ならびに水分子（O）は四面体構造をとることが証明された．これらの結果から導きだされたDPPⅢの活性中心構造と触媒作用機構の予想図を図8に示す．一方，サーモライシンならびにカルボキシペプチダーゼAの銅イオン置換酵素はそれぞれの酵素活性をほとんど失う[31,32]のに対し，DPPⅢの場合は，銅ならびにコ

表 4：Kinetic parameters and zinc contents of the mutated proteins
($H_{450}E_{451}LL_{453}GH_{455}$---$E_{474}$---$E_{493}$---$E_{508}$---$E_{555}$)

Mutant	K_m ×10^{-4}	k_{cat} ×Sec^{-1}	k_{cat}/K_m ×10^{4}	Zinc content mols/mol of protein
Wild-type	3.71±0.56	16.6	4.47	1.03±0.04
L^{453}-deletion	2.36±0.09	1.75	0.74	0.96±0.04
E 451 D		not detectable		1.03±0.08
E 451 A		not detectable		1.10±0.04
H 450 Y		not detectable		0.10±0.02
H 455 Y		not detectable		0.07±0.03
E 474 D	2.83±0.24	24.1	8.51	0.93±0.03
E 474 A	2.56±0.19	27.4	10.70	0.97±0.05
E 508 D	5.85±0.61	1.05	0.17	0.43±0.10
E 508 A		not detectable		0.07±0.05

表5：Kinetic parameters for Arg–Arg–NA and metal contents of various metallodipeptidyl peptidaseⅢs at pH 7.4

	K_m $\times 10^{-5}$	k_{cat} $\times s^{-1}$	k_{cat}/K_m $\times 10^{4} M^{-1} s^{-1}$	metal content atom/mol of protein
Zn^{2+}–DPPⅢ	8.1±1.0	7.2±0.2	8.8	0.8±0.1
Co^{2+}–DPPⅢ	8.2±0.9	7.0±0.1	8.5	1.0±0.1
Cu^{2+}–DPPⅢ	9.9±1.1	10.1±0.3	10.2	1.1±0.1

バルト置換酵素とも亜鉛酵素と同様の酵素化学的性質を示した（表5）．これは，DPPⅢの活性中心はより自由度が高いか，あるいは他の異なる活性機構の可能性も考えられ，生理的に重要な役割を持つ可能性が示唆された．

今後の課題

タンパク質の結晶化は，タンパク質の機能解析に多くの情報を与える．亜鉛酵素であるロイコトルエンA_4ヒドロラーゼは，アミノペプチダーゼ活性とエポキシドヒドラーゼ活性の2機能を持つ酵素で，阻害剤との複合体のX–線結晶解析データから活性中心構造（図9）[33,34]が予想され，その活性中心を構成するアミノ酸の変異実験で，アミノ末端認識アミノ酸残基（Glu^{271}，Gln^{136}）[35]やエポキシドヒドラーゼ触媒アミノ酸残基（Asp^{375}）[36]など新たに同定された．同時に，同じファミリーのアミノペプチダーゼAでは，ロイコトリエンA_4ヒドラーゼとの相同検索で，新たにエキソペプチダーゼ活性認識サイトの決定[37]，触媒部位モデルの構築[38]などがおこなわれた．他に類似酵素がまだ見出されていないDPPⅢにとって，酵素の結晶化は必須で，ドイツのマックスプランク研究所のBode博士と共同研究を進めていたが，いまだ成功していない．①DPPⅢのジペプチドを切り出す特異性の関与部位はどこか，②アミノ末端側の400残基のタンパク質部分の働きは何か，など疑問点を明らかにするため，ラット以外のDPPⅢ酵素の調整も考えて結晶化を推進したいと考えている．また哺乳動物のDPPⅢはまだ生理的役割は不明であるが，ゴキブリ[39]やショウジョウバエ[40]などの昆虫のDPPⅢは可溶型と膜結合型があり，中枢神経細胞表面に局在し神経伝達物質のプロクトリンを分解する[41]ことが明らかにされている．哺乳動物ではDPPⅢは可溶性酵素とされているが，ラット脳で膜結合型酵素の存

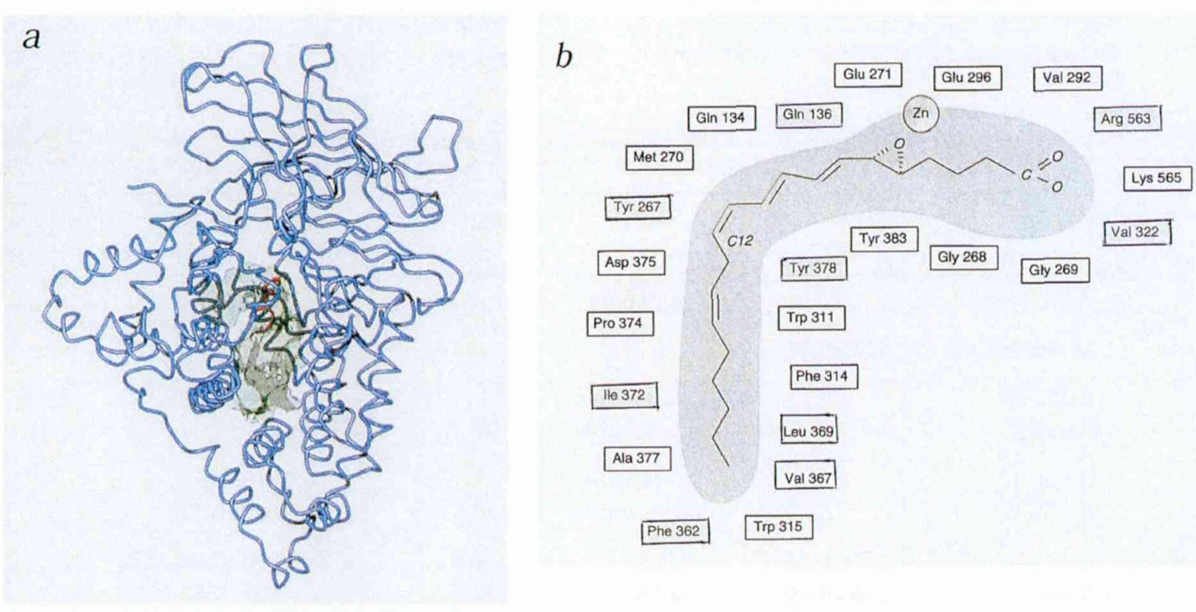

図9：The putative leukotriene A4 hydrolase (LTA_4) binding cavity. a, Transparent surface representation of the pocket (in green) with the bestatin molecule shown in red. b, Schematic representation of the proposed binding of LTA_4 into the cavity.

在が示唆されている[18]ことなどを考慮し，DPPⅢがどのような形で細胞内に存在しているのかを明らかにしたいと考えている．

文　献

1) Handbook of Proteolytic Enzymes (2004) edited by Barrett AJ, Rawlings ND and Woessner JF. Academic Press

2) Matthews BW and Weaver LH (1974) The binding of lanthanides to thermolysin. Biochemistry **13**: 1719–25.

3) Rees DC, Lewis M and Lipscomb WN (1983) Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 A resolution. J Mol Biol **168**: 367–87.

4) Schmid MF and Herriott JR (1976) Structure of carboxypeptidase B at 2–8 A resolution. J Mol Biol **103**: 175–90.

5) Sutton BJ, Artymiuk PJ, Cordero–Borboa AE, Little C, Phillips DC and Waley SG (1987) An X–ray–crystallographic study of beta–lakutamase Ⅱ from Bacillus cereus at 0.35 nm resolution. Biochem J **248**: 181–8.

6) Hough E, Hansen LK, Birknes B, Jynge K, Hansen S, Hordvik A, Little C, Dodson E and Derewenda Z (1989) High–resolution (1.5 A) crystal structure of phospholipase C from Bacillus cereus. Nature **338**: 357–60.

7) Kim EE and Wyckoff HW (1990) Structure of alkaline phosphatases. Clin Chim Acta **186**: 175–87.

8) Vallee BL and Auld DS (1990) Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Protein. Biochemistry **29**: 5647–59.

9) Kurisu G, Kinoshita T, Sugimoto A, Nagara A, Kai Y, Kasai N and Harada S (1997) Structure of the zinc endoprotease from Streptomyces caespitosus. J Biochem (Tokyo) **121**: 304–8.

10) Springman EB, Angleton EL, Birkedal–Hansen H and Wart HE (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active–site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. Proc Natl Acad Sci USA **87**: 364–8.

11) Jiang W and Bond JS (1992) Families of metalloendopeptidases and their relationships. FEBS **312**: 110–4.

12) Hooper NM (1994) Families of zinc metallopeptidases. FEBS Letters **354**: 1–6.

13) Dawlings ND and Barrett AJ (1995) Evolutionary Families of Metallopeptidases. In Methods in Enzymology 248, PP 183–228. eds.

14) Ellis S and Nuenke JM (1967) Dipeptidyl arylamidase Ⅲ of the pituitary. Purification and characterization. J Biol. Chem **242**: 4623–9.

15) Lee C–M and Snyder SH (1982) Dipeptidyl–aminopeptidase Ⅲ of Rat Brain. J Biol Chem **257**: 12043–50.

16) Shimamori Y, Watanabe Y and Fujimoto Y (1986) Purification and Characterization of Dipeptidyl Aminopeptidase Ⅲ from Human Placenta. Chem. Pharm. Bull **34**: 3333–40.

17) Abramic M, Zubanovic, M and Vitale L (1988) Dipeptidyl peptidase Ⅲ from human erythrocytes. Biol. Chem. Hoppe–Seyler **369**: 29–38.

18) Gorenstein C and Snyder SH (1980) Enkepharinases. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci **210**: 123–32.

19) Kokubu T, Akutsu H, Fujimoto S, Ueda E, Hiwada K and Yamamura Y (1969) Purification and properties of endopeptidase from rabbit red cells and its process of degradation of angiotensin. Biochim Biophys Acta **191**: 668–76.

20) Fukasawa K, Fukasawa KM, Kanai M, Fujii S, Hirose J and Harada M (1998) Dipeptidyl peptidase Ⅲ is a zinc metallo–exopeptidase. Biochem J **329**: 275–82.

21) Fukasawa K, Fukasawa KM, Iwamoto H and Hirose J (1999) HELLGH motif of rat Liver Dipeptidyl peptidase Ⅲ is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. Biochemistry **38**: 8299–303.

22) Vazeux G, Wang J, Corvol P and Llorens–Cortes C. (1996) Identification of residues essential for catalytic activity and zinc coordination in Aminopeptidase A. J Biol Chem **271**: 9069–74.

23) Fukasawa KM, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S and Harada M (1996) Molecular cloning and expression of rat liver Aminopeptidase B. J Biol Chem **271**: 30731–5.

24) Fukasawa KM, Fukasawa K, Harada M, Hirose J, Izumi T and Shimizu T (1999) Aminopeptidase B is structurally related to leukotoriene–A_4 hydrolase but is not a bifunctional enzyme with epoxide hydrolase activity. Biochem J **339**: 497–502.

25) Goodwill KE, Sabatier C, Marks C, Raag R, Fitzpatrick PF and Stevens RC (1997) Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 A and its implications for inherited neurodegenerative diseases. Nat Struct Biol **4**: 578–85.

26) Monzing AF and Matthews BW (1984) Binding of N-carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by x-ray crystallography: a novel class of transition-site analogues for zinc peptidases. Biochemistry **23**: 5724–9.
27) Hirose J, Iwamoto H, Nagao I, Enmyo K, Sugao H, Kanemitsu N, Ikeda K, Takeda M, Inoue M, Ikeda T, Matsuura F, Fukasawa KM and Fukasawa K (2001) Characterization of metal-substituted dipeptidyl peptidase Ⅲ (Rat liver). Biochemistry **40**: 11860–5.
28) Hirose J, Kamigakiuchi H, Iwamoto H, Fujii H, Nakai M, Takenaka M, Kataoka R, Sugawara M, Yamamoto S and Fukasawa KM (2004) The metal-binding motif of dipeptidyl peptidase III directly influences the enzyme activity in the copper derivative of dipeptidyl peptidase III. Arch Biochem Biophs **431**: 1–8.
29) Rosenberg RC, Root CA, Bernstein PK and Gray HB (1975) Spectral studies of copper (Ⅱ) carboxypeptidase A and related model complexes. J Am Chem Soc **97**: 2092–6.
30) Rosenberg RC, Root CA and Gry HB (1975) Electronic spectral and magnetic susceptibility studies of nickel (Ⅱ) and cobalt (Ⅱ) carboxypeptidase A complexes. J Am Chem Soc **97**: 21–6.
31) Auld DS, Geoghegan K, Galdes A and Vallee BL (1986) Rapid-scanning cryospectroscopy of enzyme-substrate-inhibitor complexes of cobalt carboxypeptidase A. Biochemistry **25**: 5156–9.
32) Holmquist B and Vallee BL (1974) Metal substitutions and inhibition of thermolysin: Spectra of the cobalt enzyme. J Biol Chem **249**: 4601–7.
33) Thunnissen MMGM, Nordlund P and Haeggström JZ (2001) Crystal structure of human leukotriene A_4 hydrolqase, a bifunctional enzyme in influammation. Nature Strl Boil **8**: 131–5.
34) Thunnissen MMGM, Andersson B, Samuelsson B, Wong C-H and Haeggström JZ (2002) Crystal structures of leukotriene A4 hydrolase in complex wiyh captopril and two competitive tight-binding inhibitors. FASEB J **16**: 1648–50.
35) Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM and Haeggstrom JZ (2002) Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase. Glutamatre 271 is a catalytic resaidue with specific roles in two distinct enzyme mechanisms. J Biol Chem **277**: 1398–404.
36) Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM, Samuelsson B and Haeggström JZ (2002) Leukotriene A4 hydrolase: selective abrogation of leukotriene B4 formation by mutation of aspartic acid 375. Pro Natl Acad Sci USA **99**: 4215–20.
37) Rozenfeld R, Iturrioz X, Okada M, Maigret B and Llorens-Cortes C (2003) Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of a new residue, glutamate 215, involved in the exopeptidase specificity of Aminopeptidase A. Biochemistry **42**: 14785–93.
38) Rozenfeld R, Iturrioz X, Maigret B and Llorens-Cortes C (2002) Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of two structural residues, Arg-220 and Asp-227, in Aminopeptidase A. J Biol Chem **277**: 29242–52.
39) Mazzocco C, Fukasawa KM, Raymond A-A and Puiroux J (2001) Purification, partial sequencing and characterization of an insect membrane dipeptidyl aminopeptidase that degrades the insect neuropeptide proctolin. Eur J Biochem **268**: 4940–9.
40) Mazzocco C, Fukasawa KM, Auguste P and Puiroux J (2003) Characterization of a functionally expressed dipeptidyl aminopeptidase Ⅲ from *Drosophila melanogaster*. Eur J Biochem **270**: 3074–82.
41) Mazzocco C, Gillibert-Duplantier J, Neaud V, Fukasawa KM, Claverol S, Bonneu M and Puiroux J (2006) Identification and characterization of two dipeptidyl-peptidase Ⅲ isoforms in *Drosophila melanogaster*. FEBS J **273**: 1056–64.
42) Coleman JE and Vallee BL (1961) J Biol Chem **236**: 2244–9.
43) Lindskog S and Nyman PO (1964) Biochim Biophys Acta **85**: 462–74.
44) Rohm KH (1985) Matal binding to yeast aminopeptidase I. Eur J Biochem **146**: 633–9.
45) Matthews BW (1988) Structural basia of the action of thermolysin and related zinc peptidase. Acc Chem Res **21**: 333–40.