

亜鉛ペプチダーゼ中の亜鉛イオンの性質 —アミノペプチダーゼ B、ジペプチジルペプチダー ゼ III を例として—

廣瀬順造

ペプチダーゼには亜鉛イオンを活性部位に含んだ金属ペプチダーゼが存在する。金属ペプチダーゼ中に含まれる金属はほぼ亜鉛イオンであり、酵素中の亜鉛イオンは配位する水分子を活性化し、これがペプチド結合を攻撃し加水分解する。亜鉛結合部位には特有なモチーフ構造 (HE_{xx}H) を持つものがあるが、我々はジペプチジルペプチダーゼ III 中に新たな亜鉛結合モチーフ (HE_{xxx}H) を見いだした。この新たな亜鉛結合モチーフに結合する金属イオンの配位構造を調べた結果、歪んだ 4 面体構造であった。またアミノペプチダーゼ B 中にも亜鉛結合モチーフを見いだした。アミノペプチダーゼ B 中の亜鉛イオンは、酵素に強く結合している事が判った。

キーワード：金属酵素、亜鉛ペプチダーゼ、金属結合部位の構造

ペプチダーゼは、ペプチド結合加水分解反応の発現に直接関与する残基の種類により、4 種に (セリンペプチダーゼ、チオールペプチダーゼ、金属ペプチダーゼ、酸性ペプチダーゼ) 分類される。それらの中で金属 (亜鉛イオン) を酵素中に含む、金属ペプチダーゼ中の金属イオンの役割について本論では詳しく述べる。1963 年にボストンにあるハーバード大学医学部の B.L. Vallee 教授が、カルボキシペプチダーゼ A 中に亜鉛イオンが含まれており、亜鉛イオンが酵素の活性発現に重要な役割を演じていることを初めて発見した (1)。この発見を契機として、種々の金属酵素中での金属イオンの活性発現に果たす役割について研究が始まった。また、同時期にボストンにあるマサチューセッツ工科大学(MIT)の Lipskomb 教授が、カルボキシペプチダーゼ A の X 線結晶構造解析に成功したのを契機に、金属ペプチダーゼの構造と機能との関係が急速に明らかになっていった (2)。Lipskomb 教授は、カルボキシペプチダーゼ A の X 線結晶構造解析によりノーベル賞を受け、これに刺激されてますます金属ペプチダーゼの研究が発展し、今日に至り、現在まで多くの研究がなされ、多くの真理が解明された。

一次構造からの亜鉛ペプチダーゼの分類

種々の亜鉛ペプチダーゼの X 線結晶構造解析とそのアミノ酸配列が、多くの亜鉛ペプチダーゼで明らかに

なるにつれて、亜鉛結合残基のモチーフの種類により三種の亜鉛ペプチダーゼに分類できる事が知られるようになった。これを表1に示す(3)。亜鉛結合部位のモチーフ構造は、HExxH...E、及び HExxH...H タイプ、そして全く HExxH モチーフを持たないタイプの酵素である。HExxH...E、及び HExxH...H

表1 亜鉛ペプチダーゼ中の亜鉛結合部位のモチーフ構造 (3)

motif	HExxH....E	HExxH....H	without HExxH
	thermolysin pseudolysin bacyllolysin leukotrien A4 hydrolyase peptidyl-dipeptidase A	astasin neutrophil collagenase adamalysin envelysin matrilysin	carboxypeptidase A insulysin lysin carboxypeptidase

タイプは、いずれも HExxH というモチーフ配列を持っている。多くの HExxH モチーフを持つ亜鉛酵素の X-線結晶構造解析が明らかになり、

なぜ HExxH モチーフ上の His 残基間に必ず 3 残基のアミノ酸が存在するのが明らかになった。HExxH モチーフを持つ亜鉛酵素は、図 1 a に示すように、HExxH 部分が α ヘリックス構造をとっており、 α ヘリックスは 3.6 残基で一回転するという事実と深い関係にあった。まず、亜鉛

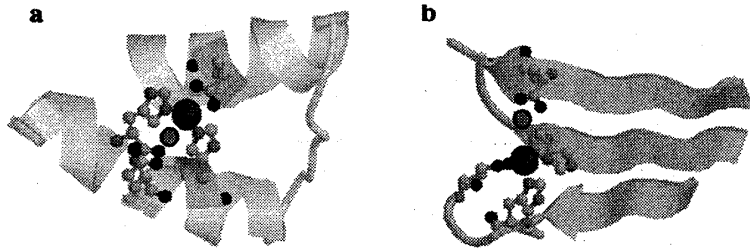


図1 代表的な亜鉛ペプチダーゼである Thermolysin と Carboxypeptidase A の亜鉛結合部位 a: Thermolysin b: Carboxypeptidase A

イオンは、HExxH の左端に存在する His 残基に結合し、そして Exx と 3 残基で α ヘリックスはほぼ一回転し、HExxH モチーフの右端の His 残基と再度結合するのである。一方、HExxH を持たない亜鉛酵素であるカルボキシペプチダーゼ A では、図 1 に示す様に β シート構造の端の上に亜鉛イオンに配位する残基や活性に関与する残基が存在するため、HExxH の様のモチーフ配列を必要としない。さて、HExxH モチーフ上の His の隣にある E (Glu) はどのような役割をするのであろうか？ 図 1 a に示すように His 残基の隣の Glu 残基は、亜鉛イオンに配位する水分子と水素結合し、水分子が水酸化イオンになるのを助けていると思われる。それ故、この Glu 残基は活性に必須であることが知られている。

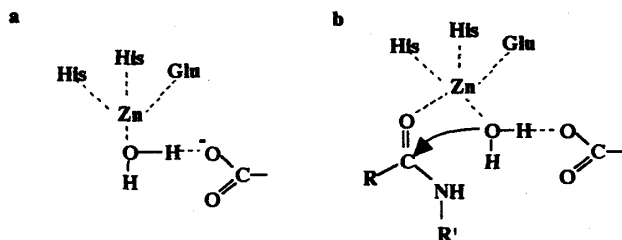


図2 ペプチダーゼ活性発現における亜鉛イオンの役割 (4)
a: 休止状態の亜鉛酵素 b: 基質が結合した反応中間体状態

亜鉛ペプチダーゼの反応機構

B.L. Vallee 博士が、カルボキシペプチダーゼ A には亜鉛イオンが結合しており活性は発現に亜鉛イオンが直接関与する事を明らかにして以来 (1)、さまざまな研究者によりその反応機構が研究されてきたが、10 年ほど前に、イタリアのサンミネアートで、フィレンツェ大学の I. Bertini 教授が主催して、亜鉛酵素の研究者だけを集めた

亜鉛ペプチダーゼの構造と機能

学会が開かれ、ほぼここで亜鉛結合ペプチダーゼの反応機構の共通認識が出来上がった (4)。その機構を図 2 に示す。図 2 において、酵素中の亜鉛イオンには水分子が結合しており、Glu 残基や Zn^{2+} の Lewis の酸としての影響により、水分子の水素イオンの酸解離定数が低下し、生理的 pH で水酸基となる。ここに基質が結合すると、酵素中の亜鉛イオンは基質であるペプチド結合のカルボニルの酸素原子と結合し、中間体状態で亜鉛イオンは 5 配位状態をとる。そして、基質であるペプチドのカルボニルの炭素原子に対して、亜鉛に配位した水酸基が求核攻撃しペプチド結合を切断するというものである。

さて、以上述べてきた亜鉛ペプチダーゼの性質を踏まえ、現在私たちが取り組んでいるジペプチジルペプチダーゼ III 及びアミノペプチダーゼ B の亜鉛イオンの性質について述べる。

ジペプチジルペプチダーゼ III 中の亜鉛イオンの性質

ジペプチジルペプチダーゼ III (DPP III) は、Arg-Arg- β -naphthylamide (Arg-Arg- β -NA) に特異的に作用し Arg-Arg と β -NA に加水分解する酵素である。この酵素は、チオールペプチダーゼか金属ペプチダーゼである

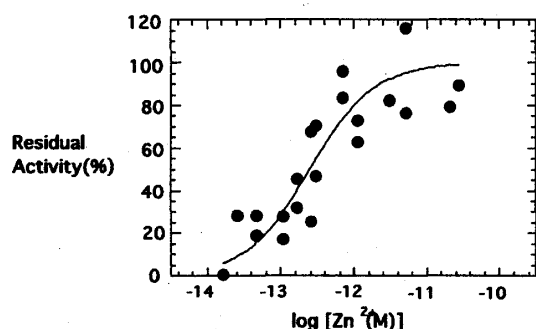


図 3 DPP III 中の亜鉛イオンの解離定数 (5)

るかがハッキリしなかった。そこで、松本歯科大学の深沢らは、人の胎盤より DPP III を精製し、その性質を決めた (5)。酵素の分子量は 84,000 で、1 分子当たり 1 原子の亜鉛イオンを含んでおり、1,10-phenanthroline の様なキレート化剤で不活性化された。金属酵素であれば金属イオンの解離定数が 10^9 M 以下である事が知られているので、DPP III 中の亜鉛イオンの解離定数を、金属キレート緩衝液を使用して求めた (5)。これを図 3 に示す。図 3 において、酵素中の亜鉛イオンは酵素に対して 1:1

で結合しており、亜鉛イオンの解離定数は、 $2.5(\pm 0.5) \times 10^{13}$ M となった。この値は、他の亜鉛ペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼ A の亜鉛イオン解離定数 3×10^{12} M と比較して 10 倍程小さい解離定数であった。この事実から、DPP III 中の亜鉛イオンは非常に強く酵素に結合しており、亜鉛含有酵素である事が明確になった。深沢らは胎盤から単離した DPP III に対する抗体を作成し、この抗体を使用し、ラット肝の c-DNA ライブラリーから、ラット肝の DPP III の c-DNA を選択し、そのアミノ酸配列を決定した。この結果を図 4 に示した。図 4 の DPP III のアミノ酸一次構造において、一般の亜鉛含有酵素に特有な HExxH モチーフを見つける事が出来なかったが、450 番目の His 残基と 455 番目の His 残基の間に HELLGH というモチーフ配列を見つけた。

```

MADTQYILPNDIGVSSLDCEAFRLLSPT E 30
RLYAHHLSRAAWYGGGLAVLLQTSPEAPYI Y 60
ALLSRLFRADDDQLRQHAEGLTEEEYQ 90
AFLVYAAAGVYSNMGNKYKSFQDTKFFVPLPK 120
EKLERVILGSKAAQHPPEEVRSLWQTCGEL 150
MFSLEPRLRHLGLGKEGVTTYFSGDCAMED 180
AKLAQDFLDSSQNLISAYNTRLFKVVGGQEGKY 210
HYEVRLASVLTPEALDSELTSLKLSYEFQ 240
GNHFQVTRGDYAPILQKVVVEHLEKAKAYAA 270
NSHQEQMLAQYVESFTQGSIEAHKRGRSFRF 300
IQDKGPIVESYIGFZIESYRDPFGSRGEFEG 330
FVAMVMKDMSAKFERLVASAEQLLKELPWP 360
PAFEKDKFLTPDFTSLDVLTFAGSGIPAGI 390
NIPNYDDLKQTEGFKMVSLSLGNVLAAYATK 420
REKLTFMEEEDKDLVIRQKGPSPFDVQVGLH 450
HELLGHGSGKLFVQDEKGFNFDQETVINPE 480
TGEQIQSWYRSGETWDSKPFSTIASSEYEECR 510
AESVGLYLCLNPPQLQIFGFEGTDAEDVIY 540
VNWLMVMRAGLLALEFYTPETANWRQAHMQ 570
ARFVILRVLLEAGEGLVTVPTTGSQGRPD 600
ARVHLDRSKIRSVGKPALERFLRRLQVLKS 630
TGDVVAGRALYEGYAAVTDAPPECFLLTRD 660
TVLLRKEKSRKLIQVQPNTRLEGSEVQLVEYE 690
ASAAGLIRSFCEFRFEDGPELEEVLTQLAT 720
ADAQFWRDQVQEAESGQALRARSVWHLFPFQ 750
TRAVCGPELCLGGGGRAGARTLVLPQLRVV 780
MLTFSICQHFPPVHYVLTISWICTAICGGS 810
TGCLVWFPSKWEKGGSSSEK 827
    
```

図 4 DPP III のアミノ酸配列 (5)

これは一般に知られている HExxH にもう一残基加わった HExxxH というモチーフ配列であった。我々は、

廣瀬順造

これが亜鉛イオンの結合部位になりうるのではないかと考えた。そこで、DPP III において、HELLGH モチーフ上で亜鉛イオンの結合に関与すると思われる両 His 残基と、亜鉛イオンとの結合には関与しないが活性に関与するモチーフ上の Glu 残基を置き換えた部位特異的変異体を作成し、活性及び亜鉛量を測定した。また、モチーフ配列から推定すると、2 残基の His の他にもう一残基 His か Glu が配位するはずである。そこで、配位結合に関与する残基を調べる目的で、508 番目の Glu の部位特異的変異体を作成し、酵素に含有される亜鉛量と活性を測定した。それらの結果を、表 2 に示す。また、HExxxH タイプのモチーフを、一般的な HExxH タイプのモチーフにするために、DPP III 上の HELLGH モチーフから 453 番目の Leu を delet した L453 deletion 部位特異的変異体を作成した。これらの結果をまとめて、表 2 に示した (6)。

表 2 部位特異的変異 DPPIII の酵素活性と亜鉛含有量 (6)

mutated DPP III	K_m ($\times 10^{-4} M$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\times 10^4$)	zinc content (atom/mole)
wild type	3.71 ± 0.56	16.6	4.47	1.03 ± 0.04
L453 deletion	2.36 ± 0.09	1.75	0.74	0.96 ± 0.04
E451D	-	-	-	1.03 ± 0.08
E451A	-	-	-	1.10 ± 0.04
E508E	5.85 ± 0.61	1.05	0.17	0.43 ± 0.10
E508A	-	-	-	0.07 ± 0.05
H450Y	-	-	-	0.10 ± 0.02
H455Y	-	-	-	0.07 ± 0.03

表 2 において、一般的な亜鉛結合モチーフ HExxH と同様なモチーフ配列を持つ L453 deletion は、亜鉛イオンを結合しており、wild type と比較して少し低下するが、酵素活性を示す。亜鉛イオンに配位すると思われる 450 番目の His や 455 番目の His を Tyr に置き換えると、

酵素から亜鉛イオンは失われ、酵素活性が消失する。それ故、450 番目の His と 455 番目の His は、亜鉛イオンの結合残基であることを示している。そのモチーフ構造から、亜鉛イオンとの結合に関与せず、活性のみに関与していると思われる 451 番目の Glu を、Asp や Ala に部位特異的変異をすると、酵素の活性は失われるが、亜鉛イオンは結合していた。一般的な亜鉛酵素と同様に、この事は HExxxHモチーフ上の Glu が活性に深く関与している事を示していた。また、亜鉛イオンに配位する二つの His 残基の三番目の配位残基を探るために、508 番目の Glu を Ala と Asp に部位特異的変異した酵素の活性と亜鉛量を測定した。Ala に部位特異的変異した場合、活性も亜鉛量も失われた。しかし、Glu のエチレン基がひとつ短くなった Asp の場合は、亜鉛イオンは不完全ながら結合し、活性も示した。このことから第 3 番目の配位残基は 502 番目の Glu 残基であろうと推定できた。以上の結果より、DPP III の亜鉛イオンに配位する残基を図 5 に示す様に推定した。亜鉛イオンの配位残基は推定できたが、その配位構造は依然として不明であった (6)。そこで酵素の配位構造をより明確にする目的で、酵素中の金属イオンを他の金属イオンに置換することを試みた。DPP III 中の亜鉛イオンをキレート化剤で除去しアポ酵素を作成する。その後、銅イオンやコバルトイオンをアポ酵素に添加し金属置換 DPP III を作成し、分光学的方法によりその配位構造を決定した。コバルト置換 DPP III および銅置換 DPP III の可視部吸収スペクトルの型は、代表的な亜鉛ペプチダーゼである thermolysin (HExxH...Eモチーフ構造を持つ) のコバルト及び銅置換体の可視部吸収スペクトルと非常に類似していた。また、銅 DPP III については、電子スピン共鳴スペクトル(EPR)を測定しそのパラメーターを銅置換

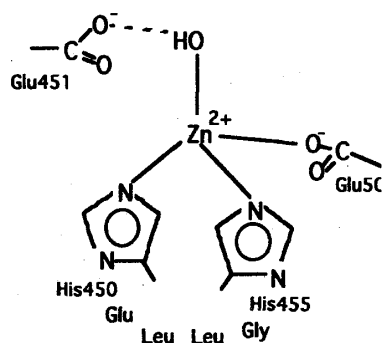


図 5 DPP III 中の活性部位の推定構造 (6, 7)

亜鉛ペプチダーゼの構造と機能

thermolysin のそれと比較したところ、その EPR パラメーターは、銅置換 thermolysin のそれと非常に類似していた。thermolysin については種々の金属置換体の X 線結晶構造解析が詳しくなされており、それによるとほぼすべての金属イオンにおいてその配位構造は歪んだ四面体構造であった。それゆえ、DPP III 中の金属イオンもその様な配位構造を取っているものと思われる。推定された DPP III 中の亜鉛イオン付近の構造を図 5 に示す(7)。では、なぜ DPP III の亜鉛結合モチーフ HELLGH が、thermolysin の亜鉛結合モチーフ (HExxH) より His 間に 1 残基余分に存在しても、thermolysin と同じ様な配位構造がとれるのか? が問題である。そこで X 線結晶構造解析が行われ HELLGH モチーフを持つ金属酵素を PDB データ上で探したところ、鉄原子を結合し、thermolysin と同じような配位構造を持っている tyrosine hydroxylase が見つかった。それ故、

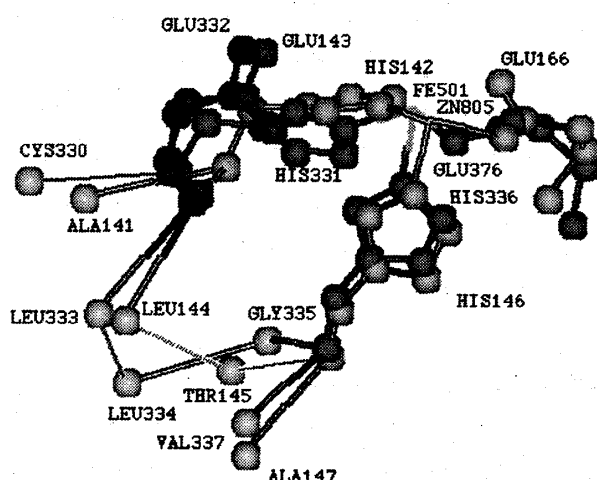


図 6 thermolysin と tyrosine hydroxylase の super impose (6)

thermolysin の亜鉛結合残基の α 炭素と、tyrosine hydroxylase の鉄イオンに結合する残基の α 炭素が重なり合うようコンピューターグラフィック処理をした。これを図 6 示す(6)。図 6 によると、tyrosine hydroxylase 上の His 残基や Glu 残基が thermolysin のそれらとほぼ重なり合う形で存在していることを示している。しかし、His 間の α ヘリックス部分を見ると、tyrosine hydroxylase は thermolysin のそれより一残基多いが、His 残基間で 4 残基がうまくヘリックスを形成している。このように α ヘリックスに変形が起きるのは、HELLGH モチーフ上の Gly 残基によるものと思われる。Gly 残基が α

ヘリックス内に存在するとヘリックスを柔らかにし、いろいろな形に変形させる得ると考えられる。このような α ヘリックスの変形がどのようにして起きるのかを、現在確かめようとしている。我々は、DPP III の HELLGH モチーフが新たな亜鉛部位モチーフになり得る事をほぼ確定した。この事実により、いままで亜鉛結合酵素ではないと考えられていた酵素が、亜鉛含有モチーフ構造を持つ事が明らかになるとと思われる。

アミノペプチダーゼ B における亜鉛イオンの性質

アミノペプチダーゼ B (APB) は、アミノ末端を認識しアミノ酸残基を一残基ずつ切り出す酵素でその分子量は 66,000 である。酵素 1 分子あたり 1 原子の亜鉛イオンを含み、亜鉛イオンを取り除くとその活性は失われる。この酵素のアミノ酸配列を図 7 に示す(8)。アミノ酸の一次構造の中に、324 番目から 328 番目

```

MESSGPSSCHSAARRPLHSAQAVDVASAS 29
SFRAFEILHLHLDLRAEFGPPGPGGSRGL 59
NGKATLELRCLLPEASELRLDSSHSCLEVMA 89
ATLLRGQPGDQQQLTEPVPHFTQPFSHYGG 119
ALCVVFPKPCAAERFLELTYYRVGEGPGV 149
CWLAEQTAGKKPFVYVYVYVYVYVYVYV 179
CFDTPAVKCTYSALVEVPDGFATBMSASTW 209
ERRGPNKFFQNSQPIPSYLIALAIIGDLAS 239
AEVGPRSRVWAEPCLEAAKEEYNGVIEEF 209
LATGEKLFQYVWGRYDILFMPSPFPFGGM 299
ENPCLTFVTPCLLAGDRSLADVIIEISHS 329
WFGNLTNANWGEFNLNEGFTMYAQRRI 359
ILFGAAYDCLAEATGRALLRQHMDVSGEEN 389
PLNKL RVKIEPGVDPDDTYNETPYBKGYCF 419
VSYLAHLVGDQEQFDKFLKAYVDEFKFSI 449
LAEDFLEFYLEYFPELKKKGVDSIPGFEN 479
RWLNTPGWPPYLPDLSPGDSLMPKAEELAE 509
LWAASEPDMQAI EAVAISTWKTYQLVYSLD 539
KILQKSPPLPPGNVKKLGETYPKISNAQNAE 569
LRLRWGQIILKNDHQEEFNKVKDFLQSQGK 599
QKTYLPLYHAMGGSEMARTLAKETFAATA 629
SQLHSNVVNYVYVYVYVYVYVYVYVYV 649
    
```

図 7 APB のアミノ酸配列 (8)

にかけて HExxH モチーフ構造が見られ、ここが亜鉛結合部位であると考えられた。そこで、亜鉛イオンに配位結合すると思われる残基を DPP III の時と同様に部位特異的

変異しその酵素活性と亜鉛含量を測定しその結果から亜鉛イオン結合残基を推定した。この結果を表 3 に示す (9)。配位すると思われる 324 番目の His や 328 番目の His を Tyr に置き換えると、酵素から亜鉛イオンは失われ、酵素活性が消失する。それ故、324 番目の His と 328 番目の His は、亜鉛イオンの結合残基であることを示している。亜鉛イオンとの結合に関与せず、活性のみに関与していると思われる 325 番目の Glu を、Asp や Ala に部位特異的変異をすると、酵素の活性は失われるが、亜鉛イオンは結合していた。一般的

表 3 部位特異的変異 APB の活性と亜鉛含有量 (9)

mutated APB	APB activity (munit/mg of protein)	zinc content (atom/mole)
wild type	58.3 ± 15.4	1.14 ± 0.28
H324Y	-	0.077 ± 0.025
E325A	-	0.997 ± 0.092
H328Y	-	0.090 ± 0.045
E347A	-	0.083 ± 0.012

亜鉛イオンに配位する二つの His 残基の他に、三番目の配位残基を探るために、347 番目の Glu を Ala に部位特異的変異し、その酵素活性と亜鉛量を測定した。Ala に部位特異的変異した場合、活性も亜鉛量も失われた。以上の結果より、APB の亜鉛イオンに配位する残基は、324 番目と 328 番目の His、そして 347 番目の Glu であると考え

られ、APB の亜鉛イオン結合モチーフは、HExxH...E タイプであると思われる (9)。

過剰な亜鉛イオンによる亜鉛ペプチダーゼの阻害

多くの亜鉛ペプチダーゼは、過剰な亜鉛イオンを加えると活性が阻害される。我々は、カルボキシペプチダーゼ A の活性が、過剰な亜鉛イオンによって、競合的に阻害される事を見出した (10)。また我々は過剰

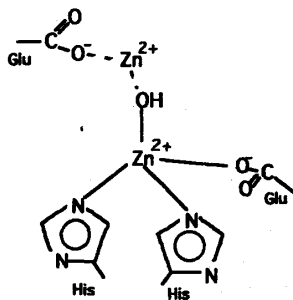


図 8 活性を阻害する過剰な亜鉛イオンの結合部位 (13)

な亜鉛イオンが結合すると、カルボキシペプチダーゼ A の Tyr 248 を arsanilazo 基で化学修飾した arsanilazo-Tyr248-carboxypeptidase A の立体構造が変化することを見つけた (11)。この後、Auld らは、過剰な亜鉛イオンが結合する部位を特定した (12, 13)。図 8 に、過剰な亜鉛イオンが結合したときの、推定構造を示す。過剰な亜鉛イオンは活性に必要な活性部位に存在する亜鉛イオンに結合した水酸基と Glu 残基の間に結合していると推定された。最近過剰な亜鉛イオンが結合したカルボキシペプチダーゼ A の X線結晶構造解析にいくつかのグループが成功した (14, 15)。その構造は Auld らが推定した構造と全く一致しており、過剰な金属イオンによる酵素活性阻害のメカニズムが明らかになった。

まとめ

我々が関わっている亜鉛ペプチダーゼについて、その亜鉛の性質について現況でまとめてみた。我々は新たな亜鉛結合モチーフを発見した。これにより、今まで、亜鉛酵素とわれていなかった多くの亜鉛結合酵素が見つかる可能性がある。多くの研究により、亜鉛ペプチダーゼの活性の発現メカニズムはほぼ解明されたといつて良い、ではこれから亜鉛酵素の解明は何を目的とするのか？亜鉛結合部位付近だけを人工的に取

亜鉛ペプチダーゼの構造と機能

り出し、遺伝子工学の技術を利用して人工酵素が出来ないか？などと夢のようなことを考えている。そうすれば、公害が無い触媒を開発できて、いわゆるグリーンケミストリーとなり得るのだが！

文献

- (1) Vallee B.L., Riordan J.F., and Coleman J.E. (1963), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 109.
- (2) Lipskomb W.N. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 29.
- (3) Lipskomb W.N. and Stroter N. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2375-2433.
- (4) Makinen M.W. (1986) *Zinc Enzymes* (ed. Bertini I. et al.; Birkhauser Boston, Inc.) p215-235.
- (5) Fukasawa K., Fukasawa K.M., Kanai M., Fujii S., Hirose J., and Harada M. (1998) *Biochem. J.* **329**, 275-282.
- (6) Fukasawa K., Fukasawa K.M., Iwamoto H., Hirose J., and Harada M. (1999) *Biochemistry* **38**, 8299-8303.
- (7) Hirose J., Iwamoto H., Nagao, I., Enmyo K., Sugao H., Kanemitsu N., Ikeda K., Takeda M., Inoue M., Ikeda T., Matsuura F., Fukasawa K.M., and Fukasawa K. (2001) *Biochemistry* **40**, 11860-11865.
- (8) Fukasawa K.M., Fukasawa K., Kanai M., Fujii S., and Harada M., (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30731-30735.
- (9) Fukasawa K.M., Fukasawa K., Harada M., Junzo Hirose, Izumi T., and Shimizu T. (1999) *Biochem. J.* **339**, 497-502.
- (10) Hirose J., Ando S., and Kidani Y. (1987) *Biochemistry* **26**, 6561-6565.
- (11) Hirose J., Noji M., Kidani Y., and Wilkins R.G. (1985) *Biochemistry* **24**, 3495-3502.
- (12) Larsen K.S., and Auld D.S. (1989) *Biochemistry* **28**, 9620-9625.
- (13) Larsen K.S., and Auld D.S. (1991) *Biochemistry* **30**, 2613-2618.
- (14) Gomez-Ortiz M., Gomis-Ruth F.X., Huber R., Aviles F.X. (1997) *FEBS Letters* **400**, 336-340.
- (15) Burkrinsky J.T., Bjerrum M.J. and Kadziola A. (1998) *Biochemistry* **37**, 16555-16564.

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Applied Biol. Sci., Fukuyama Univ. (2), 9-16 (2003)

Characterization of the Zinc Ions in Zinc-Peptidases The Examples of Aminopeptidase B and Dipeptidyl Peptidase III

Junzo Hirose

Department of Applied Biological Science, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

In many peptidases, the zinc ions are present in the active sites and directly involved in the enzyme activity. In the zinc peptidase, a water molecule coordinated the zinc ion in the active site is activated to the hydroxide ion by the zinc ion behaving as Lewis acid. The hydroxide ion coordinated

廣瀬順造

to the zinc ion attacks the carbon atom of carbonyl group of the peptide bond. Some zinc peptidases have a motif like HExxH in which the zinc ion binds. In dipeptidyl peptidase III, a new type motif like HExxxH has been found. The coordination geometry of the metal ion that binds to new type motif (HExxxH) was distorted tetrahedral. In aminopeptidase B, the motif like HExxH has also been found and it is typical zinc binding motif, so that aminopeptidase B is the zinc peptidase.

Key words: metalloenzyme, zinc-peptidase, the coordination geometry of the metal binding site.