

ラットジペプチジルペプチダーゼ IIIにおいて、  
His568 は活性発現に必須であり、Glu507 及び Glu512 は  
亜鉛イオンと配位残基である His455 及び His450 との  
配位結合を安定化する。

深澤加與子\*、廣瀬順造、秦 季之、小野行雄

*Biochim. Biophys. Acta*, **1804** (2010) 2063-2069.

**In Rat Dipeptidyl Peptidase III, His<sup>568</sup> Is Essential for Catalysis,  
and Glu<sup>507</sup> or Glu<sup>512</sup> Stabilizes the Coordination Bond between  
His<sup>455</sup> or His<sup>450</sup> and Zinc Ion.**

Kayoko M Fukasawa\*, Junzo Hirose,  
Toshiyuki Hata, and Yukio Ono

**ABSTRACT:** Dipeptidyl peptidase (DPP) III is a zinc-dependent exopeptidase that has a unique motif, “HELLGH”, as the zinc binding site. In the present study, a three-dimensional (3D) model of rat DPP III was generated as a template of the X-ray crystal structure of human DPP III (PDB: 3FVY [Dobrovetsky E. *et al.* (2009) SGC]). The replacement of the seven charged amino acid residues around the zinc ion with a hydrophobic amino acid did not cause any significant changes in  $K_m$  values or in the substrate specificity. However, the  $k_{cat}$  values of H568R and H568Y were remarkably reduced, by factors of 50 and 400, respectively. The His<sup>568</sup> residue of rat DPP III is essential for enzyme catalysis. The  $k_{cat}$  values of the mutants E507A and E512A were 2.38 s<sup>-1</sup> and 3.88 s<sup>-1</sup> toward Arg-Arg-NA, and 0.097 s<sup>-1</sup> and 0.59 s<sup>-1</sup> toward Phe-Arg-NA, respectively. These values were markedly lower than those of the wild-type DPP III. Furthermore, the zinc contents of E507A and E512A were 0.29 and 0.08 atom per mol of protein, respectively, and those mutations caused remarkable increases in the dissociation constants of the zinc ions from DPP III by factors of  $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ . The 3D model of the catalytic domain of rat DPP III showed that the carboxyl oxygen of Glu<sup>507</sup> and Glu<sup>512</sup> form the hydrogen bonds to the nitrogen atoms of His<sup>455</sup> and His<sup>450</sup>. These all results showed that Glu<sup>507</sup> or Glu<sup>512</sup> stabilizes the coordination bond between the zinc ion and His<sup>455</sup> or His<sup>450</sup>.

抄録 ユニークな亜鉛結合モチーフを持つラット起源のジペプチジルペプチダーゼIIIの立体構造を、起源の異なるジペプチジルペプチダーゼIIIのX線結晶構造解析の結果に基づいて、計算機で計算してその構造を推定した。その推定構造に基づいて、活性発現に関与する亜鉛イオンの周りに存在する7個のアミノ酸を部位特異的に変異させ酵

素活性を測定したところ、H568R と H568Y、E507A と E512A において酵素活性が大きく低下した。その原因を究明したところ、His568 は活性発現に深く関係している事が判った。他方 Glu507 及び Glu512 を Ala に置換すると、酵素中の亜鉛イオンの含量が減少した。これは亜鉛イオンの酵素に対する結合が弱くなったことを意味する。それ故、E507A と E512A 中の亜鉛イオンの結合定数を測定したところ天然の酵素より  $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$  倍もその結合定数が低下していた。その原因としては、Glu507 及び Glu512 が、亜鉛イオンと配位結合する His455 及び His450 と水素結合して、亜鉛イオンとの結合を強めている事が判った。

\* Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto Dental University, School of Dentistry, Shiojiri, Nagano 399-0781, Japan  
硬組織疾患制御再建学講座、大学院歯学独立研究科、松本歯科大学