

# 酵素反応速度論と計算化学の相補的利用による 酵素反応機構の解析

廣瀬順造、秦 季之、深澤加與子

## **Analysis of an enzymatic reaction mechanism by enzyme kinetics and computational chemistry**

Junzo Hirose, Toshiyuki Hata, Kayoko M. Fukasawa

### **ABSTRACT**

To get the information of the ternary complex (Michaelis complex) that consists of the substrate and the enzyme, the computational chemistry is very useful. The aminoacid sequence of the active site of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase is very similar to that of aminopeptidase B. On the basis of the 3D structure of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase, docking simulation of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase with the substrate of aminopeptidase B showed the important residues involved in the expression of aminopeptidase B activity. These important residues involved in the recognition of the substrate binding of aminopeptidase B were determined by the point mutation. Latanoprost and timolol are used in the treatment of glaucoma. The effect of these drugs on the activity of human-carbonic anhydrase I and II were determined by the enzyme kinetics. Latanoprost is the inhibitor and timolol is the activator. Docking simulation of latanoprost and timolol with human-carbonic anhydrase I and II showed that latanoprost binds to the narrow active site cavity and that timolol binds to the entrance of the active site. The 3D structure modeling of rat-dipeptidylpeptidase III was performed by a Swiss-MODEL homology modeling server using human dipeptidylpeptidase III structure. The 3D structure model of catalytic domain of rat-dipeptidylpeptidase III shows that the carboxyl oxygen atoms of Glu<sup>507</sup> and Glu<sup>512</sup> are respectively engaged in the hydrogen bonds with the nitrogen atoms of the imidazole rings of His<sup>455</sup> and His<sup>450</sup>, and these hydrogen bonds stabilize the coordination bond between the zinc ion and His<sup>455</sup> or His<sup>450</sup>.

## はじめに

もう 20 年も前になるが、廣瀬が福山大学工学部食品工学科に助教授として赴任したときに、京都大学農学部から移ってこれら酵素反応速度論で有名な廣海啓太郎教授に頂いたテーマは「銅イオンを持つビリルビン酸化酵素を使い、酵素と基質が形成するミカエリス中間体をなんとか分光学的に捉える事が出来ないか」と言うものであった。しかし、ビリルビン酸化酵素の反応は非常に早く、また基質の 1 つが  $O_2$  というやっかいな気体であったので残念ながら、私の力量ではミカエリス中間体を捉える事が出来なかった。この廣海先生から提案されたテーマは、廣海先生が福山大学を退職後もずっと私の心に残り続けた。ある生化学会で X 線結晶解析法や分光法などで酵素反応機構を追求している有名な先生が、特別講演中に「やはり酵素反応機構の反応中間体は最終的には計算化学の助けをもらわないと判りませんな～」と発言され、私に深い印象を与えた。私はそのころ松本歯科大学の深澤先生と、部位特異的変異体・酵素反応速度論・錯体化学などの手法を組み合わせる研究を行っていたが、それに異分野の計算化学を加えれば新たな切り口の研究が出来ると思いついた。そこで、薬学部の小野研究室の秦先生の協力を得て、計算化学と生化学を相補的に利用し、酵素反応機構を解明する研究を開始した。それから 5 年、その間に私自身も薬学部に移り、「酵素反応速度論と計算化学を組み合わせた研究」は、現在執筆中のものを合わせれば 6 報の論文となり、これらの成果の一部をまとめた総説 (文献 7)) が現在審査中である。この総説は、この 5 年間の研究成果である文献 1) ~ 6) をまとめたものである。

我々は、部位特異的変異酵素の酵素反応速度論から得られた結果と、計算化学で得られた結果を相補的に比較検討し、酵素反応機構の解明に役立てようとしている。そして現在、次の二つの方法を用いてミカエリスの反応中間体の構造の推定に役立てようとしている。

1. ドッキングシミュレーション法による酵素反応中間体の構造と酵素反応速度論より得た結果の比較。
2. 計算化学による酵素及びその部位特異的変異体の立体構造予測

以上の論点で概説する。

### 1. ドッキングシミュレーション法を用いた、酵素中の基質および阻害剤・活性化剤の結合部位の探査

#### 1-1 ドッキングシミュレーションによるアミノペプチダーゼ B 中の基質認識に関与する残基の解明<sup>1)</sup>

深澤らは、ラットのアミノペプチダーゼ B (ApB) の一次構造を明らかにし、この酵素が典型的な亜鉛モチーフ配列 (HEXXH...E) を持つペプチダーゼである事を明らかにした<sup>8)</sup>。

我々と深澤らの共同研究により、ApBに含まれる1原子の亜鉛イオンが直接活性の発現に関与している事を証明した<sup>9)</sup>、そしてApBにおいて亜鉛イオンに配位すると思われる残基を部位特異的に変異させ、酵素活性・亜鉛量を測定することで、亜鉛イオンに配位する残基を特定した<sup>9)</sup>。亜鉛金属イオンの配位残基は、亜鉛モチーフ上のHis<sup>324</sup>とHis<sup>328</sup>、そして亜鉛結合モチーフから19残基はなれたGlu<sup>347</sup>であった<sup>9)</sup>。また、亜鉛結合モチーフのHis<sup>324</sup>の隣に存在するGlu<sup>325</sup>は、酵素活性の発現に必須である事を証明した<sup>1,9)</sup>。

アミノペプチダーゼBは、基質であるペプチドのアミノ末端を認識し、基質のアミノ末端から1残基ずつペプチド結合を加水分解して切り離す酵素であり、アミノ末端がArgやLysなどの正電荷を持つ残基に高い活性を示す事が知られている<sup>10)</sup>。ApBのX線結晶構造解析はまだまだ行われておらず、ApBは基質であるペプチドのアミノ末端の正電荷をどの様に認識し、また同時にアミノ末端の側鎖のArgやLysなどの正電荷をどの様に選択的に認識するのかが不明であった。そこでApB中のどの残基が基質のアミノ末端の正電荷と側鎖上の正電荷を認識するかを、部位特異的変異の手法を用いて明らかにしようとした。

我々は、基質であるペプチドのアミノ末端のアミノ基の正電荷と側鎖の正電荷を特異的に認識するのが酵素中の負電荷を持った残基であると考えた。そして、それはすなわちカルボキシル基を持ったGluかAspであるはずであると予測した。しかし、ApB中のどのGluやAspを部位特異的に変異させたら良いかは判らない。そこで、X線結晶構造解析が行われているロイコトリエンA4加水酵素(LTA4H)を参考にした<sup>11)</sup>。LTA4Hは、ApBとのアミノ酸



**Fig.1** Alignment of the rat ApB amino acid sequence with those of rat LTA4H. Mutated amino acid residues are denoted by arrows. The conserved motifs and tyrosyl residue in a mono-zinc aminopeptidase are shown by box on those amino acid sequences.

配列の相同性が 34 % であり<sup>12)</sup>、Leukotriene A4 を加水する反応の他に、ApB と同じようなアミノペプチダーゼ活性を示す事が知られるユニークな酵素である。そのユニークさゆえに、活性に関与する残基が詳しく検討されている。そこで、LTA4H の立体構造を参考に、ApB 中の部位特異的に変異する Glu(E) 残基及び Asp(D) 残基を決定した。ApB の一次構造を LTA4H の一次構造とともに Fig.1 に示した。Fig. 1 において部位特異的変異をおこなった残基を黒の矢印で示し、また種々のアミノペプチダーゼと共通するモチーフ配列を Box で囲って示した。

ApB のアミノ酸配列において、亜鉛結合モチーフを我々がすでに明らかにしており<sup>9)</sup>、また種々のアミノペプチダーゼにおける部位特異的変異の結果から、GGMEN モチーフは、アミノ末端のアミノ基を認識する事が推定されていた<sup>13-15)</sup>。ApB 中の Glu(E) を Gln(Q) に、Asp(D) を Asn(N) に変換した種々の部位特異的変異体から得られた酵素反応速度パラメータを Table1 に示した。 $k_{cat}/K_m$  をそれぞれの部位特異的変異体で比較してみると、Glu<sup>300</sup> を Gln に置き換えた E300Q では活性が消失し、Asp<sup>405</sup> を Asn に置き換えた部位特異的変異体 D405N では活性が 1/30 まで低下した。それゆえ、ApB 中の Glu<sup>300</sup> と Asp<sup>405</sup> の残基が基質の正電荷を認識している可能性が高い事が分かった。Glu<sup>300</sup> は、他のアミノペプチダーゼの部位特異的変異体の研究から、基質のアミノ末端を認識すると推定されるモチーフ配列 GXMEN 上に存在している。それゆえ、Glu<sup>300</sup> は基質のアミノ末端のアミノ基の正電荷を認識していると考えられる。そうすると、Asp<sup>405</sup> は必然的に基質であるペプチドのアミノ末端のアミノ酸の側鎖に存在する正電荷 (Arg や Lys の側鎖の正電荷) を認識する残基である可能性がある。これら部位特異的変異体の結果から、ApB 中の Glu<sup>300</sup> が基質であるアミノ末端のアミノ基を認識し、Asp<sup>405</sup> がアミノ末端のアミノ酸残基 (Arg や Lys) の側鎖部分の正電荷を認識し、基質と結合し

**Table 1 Kinetic Parameters for Wild-Type and Mutated ApBs<sup>a)</sup>.**

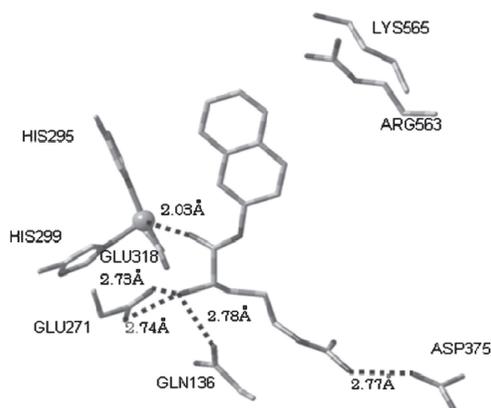
	$K_m$ ( $\times 10^{-5}$ M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Wild-type	8.8±1.3	54.1±2.5	$6.2 \times 10^5$
E256Q	9.9±2.7	51.8±2.4	$5.2 \times 10^5$
E260Q	6.2±1.4	12.0±0.9	$1.9 \times 10^5$
E267Q	11.9±2.0	24.1±0.6	$2.0 \times 10^5$
E268Q	6.4±0.6	11.7±0.5	$1.8 \times 10^5$
E300Q		ND <sup>b)</sup>	
D315N	12.5±1.4	38.0±2.9	$3.0 \times 10^5$
E387Q	10.9±0.8	60.0±1.4	$5.6 \times 10^5$
E388Q	11.1±2.3	53.3±1.5	$4.8 \times 10^5$
D405N	12.3±1.2	2.1±0.03	$1.7 \times 10^4$
D406N	3.0±0.5	19.6±0.7	$6.6 \times 10^5$
E410Q	12.8±2.8	6.3±0.5	$5.0 \times 10^4$
E414Q	38.4±1.8	13.5±0.3	$3.5 \times 10^4$

<sup>a)</sup> Data are means±SD of two separate experiments with duplicate determinations.

<sup>b)</sup> not detectable.

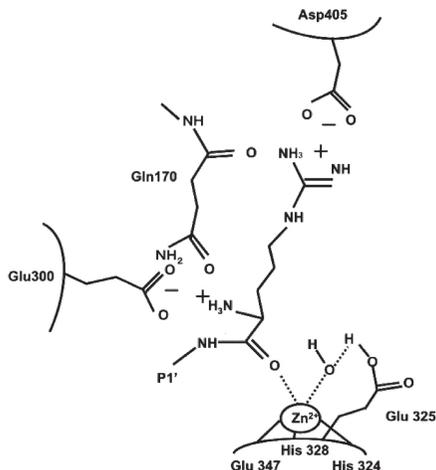
ている事が推定された。

それゆえ、酵素のこのような基質認識がより具体的にどの様に起こっているかを解明しようと、X線結晶構造解析で立体構造が判明しており、ApBと同様なペプチダーゼ活性を示すLTA4Hを用いて、ApBの基質の中で最も比活性が高いArg- $\beta$ -naphthylamide (Arg- $\beta$ -NA)を計算化学でドッキングシミュレーションした<sup>16-18)</sup>。この結果をFig. 2に示す。Fig. 2において、基質であるArg- $\beta$ -NAのアミノ末端にあるアミノ基は、Glu<sup>271</sup>およびGln<sup>136</sup>と水素結合していた。LTA4HのGlu<sup>271</sup>はApBのGlu<sup>300</sup>に相当し(Fig.1参照)、部位特異的変異体の酵素活性から予測した結果と一致した。また、基質であるArg- $\beta$ -NAのArg側鎖のグアニジル基の正電荷はAsp<sup>375</sup>と相互作用しており、LTA4HのAsp<sup>375</sup>はApBのAsp<sup>405</sup>に相当しており(Fig.1参照)、これも部位特異的変異体の酵素活性から予測した結果と一致した。また、Arg- $\beta$ -NAと基質の相互作用のドッキングシミュレーションの結果は、基質の加水分解されるペプチド結合部分のカルボニルの酸素原子が亜鉛イオンに配位結合しており、多くの亜鉛ペプチダーゼの実験から提唱されているようなミカエリス中間体の予想結果と一致した。この様に基質を酵素にドッキングシミュレーションする方法は、より詳細に酵素に対する基質の結合の様子を明らかにする事ができた。



**Fig. 2** The most favorable interaction mode of Arginyl- $\beta$ -naphthylamide with Leukotriene A4 hydrolase obtained from a docking simulation using by Autodock 3.0.5. The carbonyl group of Arg- $\beta$ -NA is bound to the zinc ion. The interatomic distance between the oxygen of the carbonyl group and the zinc atom is 2.03 Å. The terminal amino group of Arg- $\beta$ -NA is bound to Gln136 and Glu271. In addition, the guanidino group of Arg- $\beta$ -NA is bound to Asp375 in LTA4H. Because the distances between nitrogen atoms of these groups in Arg- $\beta$ -NA and corresponding oxygen atoms of amino acid residues in LTA4H are 2.73 ~ 2.78 Å, these interactions are hydrogen bond.

以上の部位特異的変異体の酵素活性の測定結果と、ApB 類似酵素の LTA4H に対する基質 (Arg- $\beta$ -NA) のドッキングシミュレーション結果から、ApB と基質である Arg- $\beta$ -NA との結合モデルを予測し Fig. 3 に示した。



**Fig. 3 Models for the relationships between substrate and ApB. The guanidine in the substrate is bound to the negative charged Asp405 in the wild-type ApB (a) and the amino group in the substrate bound to Glu405 in the mutant D405E**

## 1-2 銅置換アミノペプチダーゼ B による基質・酵素複合体の探査<sup>2)</sup>

Fig. 2 において、ロイコトリエン A4 加水酵素 (LTA4H) へのドッキングシミュレーションの結果から、酵素中の金属イオンに基質のペプチド結合のカルボニル酸素原子が配位した状態が得られた。それゆえ、ApB 中の亜鉛イオンを他の遷移金属イオンに置き換えたら、分光法などで金属の配位構造を追跡し、ApB と基質が形成するミカエリス中間体の配位構造を明らかにする事が出来ないかと考えた。そこで、ApB 中の亜鉛イオンをキレート化剤で取り除き、 $\text{Co}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  イオンに置き換えた金属置換 ApB を作成した<sup>19-20)</sup>。

Table 2 に示すように ApB 中の亜鉛イオンを各金属で置き換えた置換体は、それぞれ金属イオンを酵素 1 分子に対しほぼ 1 原子を含有していた。また、 $\text{Co(II)-ApB}$  および  $\text{Cu(II)-ApB}$  の基質 Arg- $\beta$ -NA に対する酵素反応速度パラメータを Table 2 に示した。酵素中の亜鉛イオンをコバルトイオンに置き換えた  $\text{Co(II)-ApB}$  は天然の酵素の 79 % の酵素活性を示したが、銅イオンで置き換えた  $\text{Cu(II)-ApB}$  は全く活性を示さなかった。ApB の亜鉛イオン結合モチーフは、最も一般的な亜鉛ペプチダーゼのモチーフ配列 HEXXH...E であり、このモチーフ配列を持つ多くの酵素は酵素中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換えると活性が消失する事が知られている<sup>19,20)</sup>。 $\text{Co(II)-ApB}$  および ApB の  $K_m$  値はほぼ等しく、金属イオンの影響をあまり受けなかった<sup>21-22)</sup>。

**Table 2 Kinetic parameters for Arg- $\beta$ -NA and metal contents of various metallo- Aminopeptidases B at pH 7.4 (25 °C)**

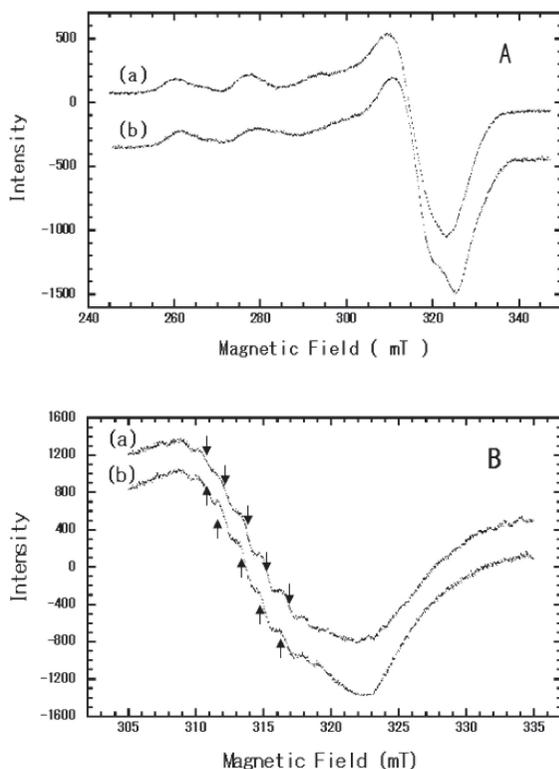
	$K_m$ ( $\times 10^{-4}$ M)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^7$ $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	Specific activity (Unit/mg)	metal contents (atom/ mole of protein)
ApB	2.67	3,186	1.193	12.5 (100%)	1.01
Co(II)-ApB	1.83	4,168	2.278	9.9 (79%)	0.93
Cu(II)-ApB	-	-	-	0.10 (1%)	0.80

ApB 中の亜鉛イオンをコバルトイオンや銅イオンに置き換えた置換体において、金属イオンがどれほどアポ-ApB に強く結合しているかを知るために、キレート化剤との競争反応を利用してアポ-ApB と金属イオンとの解離定数を求めた。その値は  $\text{Co}^{2+}$  イオンでは  $4.7 \times 10^{-12}$  M であり  $\text{Zn}^{2+}$  イオンでは  $3.7 \times 10^{-13}$  M であった。金属イオンは、いずれも強く酵素に結合している事が分かった。

Cu(II)-ApB が作成できたことにより、酵素中の金属の配位環境が簡単に電子スピン共鳴装置 (EPR) の測定を用いて、明らかにする事ができる。そこで、Cu(II)-ApB の EPR スペクトルを測定し、これを Fig 4 に示した。

Fig. 4A-(a) の Cu(II)-ApB の EPR スペクトルは多くの銅イオン置換ペプチダーゼと非常に似た EPR スペクトルを示した。Fig. 4A-(a) から得られた g 値を、他の種々の Cu(II)-ペプチダーゼの値と共に Table 3 に示し比較した。これらのパラメータをみると、Cu(II)-ApB の配位構造は酵素中の亜鉛イオンを銅イオンで置換した Thermolysin と非常に似ていた。Thermolysin 中の銅イオンは歪んだ四面体の配位構造を持つことが X 線結晶構造解析で知られているので、ApB 中の銅イオンもこの様な配位構造を持つことが分かった。Fig. 4B-(a) に、Cu(II)-ApB の EPR スペクトルの 305 ~ 345mT の部分を拡大し詳しく測定した結果を示した。Fig. 4B-(a) において矢印で示した 5 本の超微細構造のピークが見られる。この超微細構造は窒素原子の核スピンとの相互作用により出現するが、この結果より 2 個の窒素原子が銅イオンに配位している事が分かった。これは銅イオンに配位した His 残基の窒素原子によるものであり、我々が推定した ApB の亜鉛モチーフ配列の 2 個の His 残基が、金属イオンに結合している事を支持していた。

我々は ApB に活性部位が類似している LTA4H に基質である Arg- $\beta$ -NA をドッキングシミュレーションし、基質のペプチド部分のカルボニル基の酸素原子が亜鉛イオンに結合する事を明らかにした。そこで、Cu(II)-ApB に基質である Arg- $\beta$ -NA が十二分に結合する条件 ( $K_m$  の数倍以上の基質濃度) で、Arg- $\beta$ -NA を加えて Cu(II)-ApB に Arg- $\beta$ -NA が結合するかどうかを EPR スペクトルを用いて検討した。基質を  $K_m$  値の約 5 倍の 1 mM を加えた時の Cu(II)-ApB



**Fig. 4.** The EPR spectra of Cu(II)-ApB and the substrate-adduct of Cu(II)-ApB in the presence of 1 mM Arg- $\beta$ -NA at liquid nitrogen temperature in 0.05 M Tris-HCl buffer (0.075 M NaCl) at pH 7.4.

(A) The EPR spectrum between 245 and 345 mT. (a) the EPR spectrum of Cu(II)-ApB, (b) the EPR spectrum of the substrate-adduct of Cu(II)-ApB in the presence of 1 mM Arg-NA.

(B) The EPR spectrum between 295 and 345 mT. (a) the EPR spectrum of Cu(II)-ApB, (b) the EPR spectrum of the substrate-adduct of Cu(II)-ApB in the presence of 1 mM Arg-NA. The peak positions of the superfine structure in the perpendicular region of the EPR spectra of Cu(II)-ApB and the substrate-adduct of Cu(II)-Ap-B are represented as short lines in panel B.

の EPR スペクトルを Fig. 4A-(b) に示した。基質が加わった時の EPR スペクトルは大きな変化を示さず、非常に Cu(II)-ApB の EPR スペクトルに似ていた。この事より、基質が結合しても大きな配位構造の変化が起こっていない事が分かった。基質を加えた Cu(II)-ApB の EPR スペクトルの 305 ~ 345mT 部分を拡大し、Fig. 4B-(b) に示した。基質が存在しない Cu(II)-ApB の EPR スペクトルと同じく、基質を加えた場合でも矢印で示したように 5 本の超微細分裂を示した。それゆえ、基質が結合しても新たな基質の窒素原子は配位しない事が分かった。以上の結果はドッキングシミュレーションで明らかになった基質の結合様式を支持していた。

**Table 3 EPR Parameters of Cu(II)-Peptidases**

	g <sup>⊥</sup>	g <sup>∥</sup>	A <sub>∥</sub> (x10 <sup>-4</sup> cm <sup>-1</sup> )
Cu(II)-ApB <sup>a)</sup>	2.06	2.27	157
Cu(II)-ApB + Arg-β-NA <sup>a)</sup>	2.06	2.27	164
Cu(II)-dipeptidyl peptidase III <sup>b)</sup>	2.07	2.27	167
Cu(II)-Leu453-deleted-dipeptidyl peptidase III <sup>c)</sup>	2.06	2.27	161
Cu(II)-thermolysin <sup>d)</sup>	2.06	2.26	163
Cu(II)-carboxypeptidase A <sup>e)</sup>	2.05	2.33	115

<sup>a)</sup>Reference 2) <sup>b)</sup>Reference 19) <sup>c)</sup>Reference 20) <sup>d)</sup>Reference 21) <sup>e)</sup>Reference 22)

### 1-3 緑内障治療薬による炭酸脱水酵素活性の阻害および活性化機構のドッキングシミュレーションによる解明

緑内障に対して、一般的に用いられている炭酸脱水酵素阻害剤とチモロールあるいはラタノプロストを同時投与すると、ラタノプロストでは炭酸脱水酵素阻害剤と併用すると眼圧が大きく低下するのに対し、チモロールは炭酸脱水酵素阻害剤と併用した場合には弱い眼圧低下しか得られず、かえってチモロール単独の場合の方が、眼圧低下は大きいことが広島大学の塚本医師・薬剤部の池田博士らによって臨床的に発見された。そこで、塚本・池田らはラタノプロストやチモロールが炭酸脱水酵素の活性に影響を与えている可能性があると考えた<sup>23,24)</sup>。

廣瀬は長年亜鉛酵素である炭酸脱水酵素の活性反応機構を研究していた経緯もあり、広島大学の池田・塚本先生達と「炭酸脱水酵素の酵素活性に対してチモロール及びラタノプロストがどの様に影響を与えるか」という、臨床と基礎研究がジョイントした共同研究を行った。

#### 1-3-1 ラタノプロストによる炭酸脱水酵素活性の阻害機構のドッキングシミュレーションによる解明<sup>3)</sup>

炭酸脱水酵素 (HCA) 活性に対して、緑内障治療薬であるラタノプロスト (プロスタグランジン F2α 関連物質) の影響を検討した。

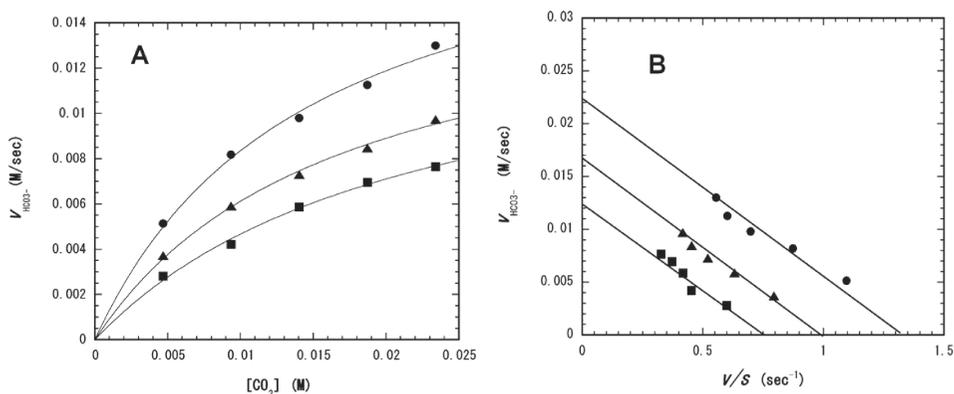
炭酸脱水酵素の活性は、基質である二酸化炭素を溶かした水と pH 色素を溶かした弱い緩衝液をストップフローにより素早く混合し、次式に示すように二酸化炭素が炭酸となり解離するプロトンによる pH 低下を色素の色調変化として測定した<sup>25)</sup>。炭酸脱水酵素 (HCA) は、人では HCA I と HCA II の二種類のアイソザイムが知られている。



基質である二酸化炭素の濃度を変え、またラタノプロストの濃度を変化させて、酵素反応速度論より、炭酸脱水酵素活性に対するラタノプロストの影響を検討し、これを Fig. 5 に示した。Fig. 5A に示すように、ラタノプロストの濃度を上げると、酵素活性が低下することからラタノプロストは炭酸脱水酵素の活性を阻害する事が分かった。ラタノプロストがどのような反応機構で炭酸脱水酵素の反応を阻害するかをより明確に知るために、(1) で示したミカエリスメンテンの式を変形し、(2) 式とした。この(2) 式に従い、酵素反応速度 ( $v$ ) と酵素反応速度 / 基質濃度 ( $v-v/s$  プロット) を Fig. 5B にプロットした。

$$v = (V_{max} \cdot s) / (K_m + s) \quad (1)$$

$$v = -K_m (v/s) + V_{max} \quad (2)$$



**Fig. 5**  $v$ - $s$  and  $v$ - $v/s$  plots in Carbonic Anhydrase I (HCA I).

**A. Relationship between  $v$  and  $s$ .**

The enzyme reaction was monitored in 0.01 M HEPES buffer (pH 7.4,  $I=0.1$ ( $Na_2SO_4$ )) containing p-nitrophenol ( $3 \times 10^{-5}$  M) at 25 °C. The concentration of latanoprost free acid was as follows: -●- 0 M; -▲-  $7.6 \times 10^{-5}$  M; -■-  $2.53 \times 10^{-4}$  M.

**B.  $v$ - $v/s$  plots**

The concentration of latanoprost free acid was as follows: -●- 0 M; -▲-  $7.6 \times 10^{-5}$  M; -■-  $2.53 \times 10^{-4}$  M.

Fig. 5B において、 $v-v/s$  プロットは一定の傾きを持った直線になった。それゆえに、阻害剤であるラタノプロストは  $V_{max}$  のみを低下させ、 $K_m$  には影響を与えない事が分かった。これはラタノプロストが典型的な非拮抗阻害剤である事を示しており、ラタノプロストは基質が結合しても結合しなくても酵素に同じ強さで結合し酵素活性を阻害する事が分かった。

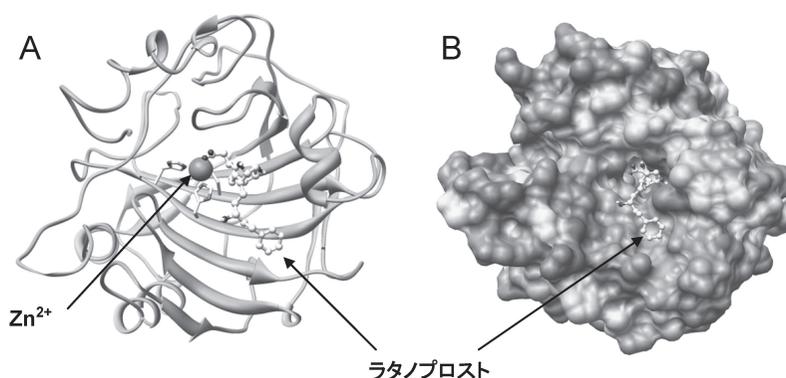
ラタノプロストがどのような強さで HCA I に結合するかを明らかにするために Dixon プロットを行い、その交点からラタノプロストの阻害定数は HCA I に対して 0.24 mM であった (Table 4)。同様にヒト炭酸脱水酵素のアイソザイムである HCA II についてもラタノプロストの阻害機構が調べられた。結果は HCA I と全く同じで非拮抗阻害を示した。得られた阻害定数を Table 4 に示す。ラタノプロストは、非拮抗的に基質である二酸化炭素の加水反応を阻害

**Table 4. Inhibition constants ( $K_i$ ) and inhibition mechanism of latanoprost free acid studied in 0.01 M HEPES buffer (I=0.1) at 25 °C ( $\pm$  indicates standard deviations).**

	$K_i$ (mM)	
	Carbonic anhydrase I (HCA I)	Carbonic anhydrase II (HCA II)
Latanoprost free acid	0.24 ( $\pm 0.11$ )	2.3 ( $\pm 0.11$ )
	Noncompetitive	Noncompetitive

する事が明らかになった。

ラタノプロストはどの様に炭酸脱水酵素に結合し、活性を阻害するかを検討する目的で、ラタノプロストを炭酸脱水酵素 (HCA I) にドッキングシミュレーションした。HCA I にドッキングシミュレーションした結果を、Fig. 6A にリボンモデルで、Fig 6B にスペースフィルモデルで示した<sup>26-29)</sup>。ラタノプロストは炭酸脱水酵素の活性部位に通じる狭い cavity にしっかりとハマり込み、ラタノプロストのカルボキシル基が活性部位に存在する亜鉛イオンに配位結合していた。このように、ラタノプロストは基質である二酸化炭素を活性部位に近づけさせないようにして、炭酸脱水酵素の活性を阻害する事が分かった。種々の陰イオンは HCA の亜鉛イオンに結合し非拮抗的に活性を阻害する。そして、陰イオンと基質は同時に亜鉛イオンに結合し、五配位状態をとると考えられている。それゆえ、ラタノプロストも他の陰イオ



**Fig. 6 Autodock simulation of latanoprost free acid-HCA I complex**

**A:** Most favorable interaction mode latanoprost free acid with HCA I (PDB code:1HUH) obtained from a docking simulation using AutoDock 3.0.5. The  $Zn^{2+}$  ion and latanoprost are shown as a sphere and a ball and stick model, respectively. The  $\alpha$ -helix and the  $\beta$ -sheet regions are shown as a ribbon model. In addition, the carbonyl group of latanoprost free acid is bound to  $Zn^{2+}$  ion in HCA I.

**B:** Most favorable interaction mode latanoprost free acid with HCA I. HCA I and latanoprost are shown as a sphere model and a ball-stick model, respectively. Latanoprost locates at the narrow cavity of the active site in HCA I.

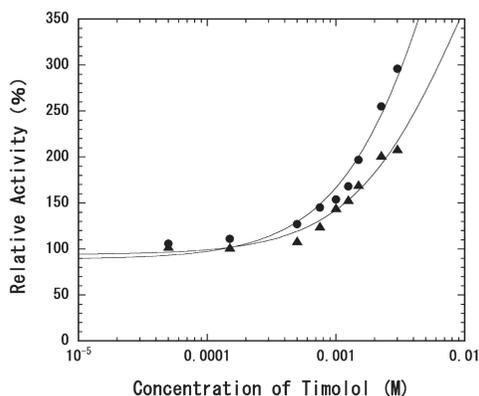
ンと同様な配位構造をとると思われる。HCA IIに対してもラタノプロストをドッキングシミュレーションしたが<sup>30)</sup>、ほぼ HCA Iと同様な結果が得られた。以上の結果からラタノプロストは炭酸脱水酵素を阻害するため、臨床において炭酸脱水酵素阻害剤とラタノプロストを同時投与した場合は、協同的に働き緑内障の眼圧を大きく下げるものと思われる。

### 1-3-2 チモロールによる炭酸脱水酵素活性の活性化機構のドッキングシミュレーションによる説明<sup>4)</sup>

炭酸脱水酵素に対して、緑内障治療薬であるチモロール（交感神経β遮断剤）の影響を検討した。炭酸脱水酵素の活性は、基質である炭酸水と pH 色素が溶かされた緩衝作用が弱い緩衝液を用い、二酸化炭素が炭酸になって解離するプロトンによる pH 変化を pH 色素の色調変化としてストップフローにより追跡する事で測定した<sup>25)</sup>。

基質である二酸化炭素の濃度を一定に保ったままチモロール濃度を変化させ、炭酸脱水酵素活性に対するチモロールの影響を検討した。その結果を Fig. 7 に示した。

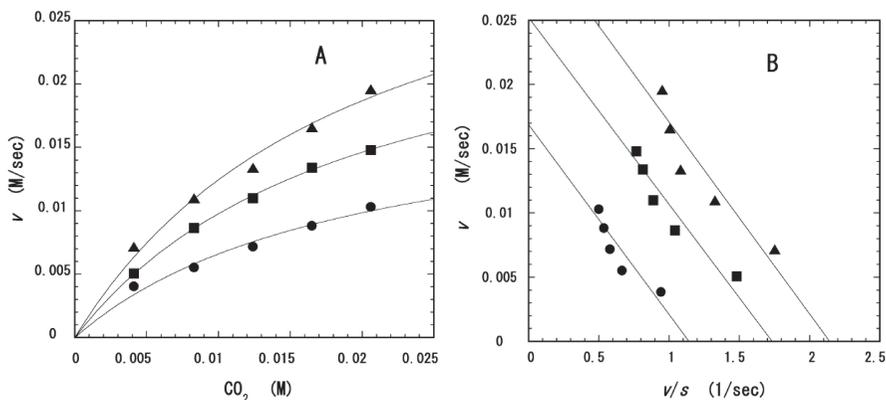
Fig.7において、炭酸脱水酵素 HCA I と HCA II 活性はチモロールによって賦活化されることが分かった。これはラタノプロストが酵素活性を阻害するのとは全く逆の結果であった。この結果を確かめるために、HCA I に対して基質の濃度とチモロールの濃度を同時に変化させた。そして、(1)式および(2)式に従い、 $v-s$ プロット、 $v-v/s$ プロットを取った。その結果を Fig. 8 に示した。Fig. 8A において、チモロールの濃度を上げると酵素活性が上昇し、それゆえチモロールは炭酸脱水酵素の活性を賦活化することが明らかとなった。Fig. 8B の  $v-v/s$ プロットは一定の傾きを持った直線になり、チモロールの濃度が濃くなるにつれて  $V_{max}$



**Fig. 7 The activation of HCA I and II hydration activities in the presence of various concentrations of timolol.**

The relative activity of HCA I or HCA II in the presence of timolol compared to that in the absence of timolol ( $((v \text{ in the presence of timolol}) / (v \text{ in the absence of timolol})) \times 100\%$ ) is plotted against the concentrations of timolol.

-●- HCA I, -▲- HCA II



**Fig. 8**  $v$ - $s$  and  $v$ - $v/s$  plots in HCA I and HCA II.

**A. Relationship between  $v$  and  $s$  in HCA I.**

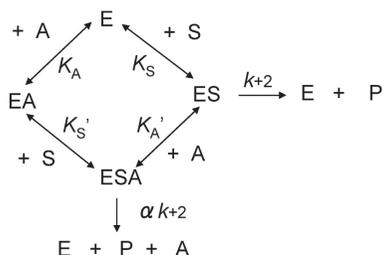
The enzyme reaction was monitored in 0.01 M HEPES buffer (pH 7.4,  $I=0.1(\text{Na}_2\text{SO}_4)$ ) containing phenol red ( $3 \times 10^{-5}$  M) at 25°C. The concentrations of timolol hemihydrate were as follows: -●- 0 M; -■-  $1.5 \times 10^{-3}$  M; -▲-  $3.0 \times 10^{-3}$  M.

**B.  $v$ - $v/s$  plots in HCA I**

The concentrations of timolol hemihydrate were as follows: -●- 0 M; -■-  $1.5 \times 10^{-3}$  M; -▲-  $3.0 \times 10^{-3}$  M.

のみが大きくなる事を示し、 $K_m$ には全く影響を与えない事が分かった。それゆえに、チモロールは炭酸脱水酵素に対して非拮抗的な賦活化剤である事を示していた。同様な実験をHCA IIに対しても行い、同じ結果が得られたのでこれらの現象を反応速度論的に導くためにチモロールの酵素に対する反応を次のScheme 1のように考えた<sup>31-32</sup>。

Scheme 1においてEは酵素を、Sは基質を、Aは賦活化剤であるチモロールを、Pは産生物をそれぞれ示す。酵素・基質複合体であるESが産生物に分解される速度定数( $k_{+2}$ )は、酵素・基質・賦活化剤の複合体であるESAが産生物に分解される速度定数( $\alpha k_{+2}$ )とは異なっている。Scheme 1において $\alpha$ は、1.0より大きいと考えられる。すなわちチモロールが酵素に結合す



$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_A' = \frac{[ES][A]}{[ESA]} \quad K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_S' = \frac{[EA][S]}{[ESA]}$$

**Scheme 1.** The activation mechanism of timolol for HCA hydration activity.

E, S, P, and A are the enzyme, the substrate, the product and the activator, respectively.

ると、結合していないものより素早く基質を産生物に分解する事を意味する。

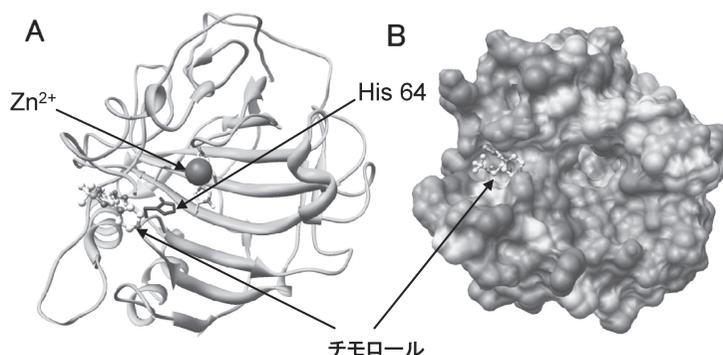
Scheme 1において、各平衡状態が素早く成立し、 $K_S'K_A$  が  $K_S K_A'$  に等しく、 $K_A$  が  $K_A'$  に等しい場合には次の式が成立する<sup>31-32</sup>。

$$v = \frac{V_{max} \frac{(1+\alpha[A]/K_A)}{(1+[A]/K_A)} S}{S+K_m} \quad (3)$$

この式は、チモロールである賦活化物質 A を加えると  $V_{max}$  は変化するが、 $K_m$  は全く変化しない事を示している。それゆえこの理論式は Fig. 8A、8B の実験事実をよく説明できる事が分かった。この (3) 式を Fig. 8A の結果に適合させて計算し、 $\alpha$  とチモロールの解離定数  $K_A$  をもとめた。その値は HCA I では、 $K_A(0.012 \text{ M})$ ,  $\alpha(5.7)$  となり、HCA II では、 $K_A(0.0091 \text{ M})$ ,  $\alpha(4.0)$  となった。HCA I および HCA II のいずれにおいても、酵素・基質・チモロール複合体が酵素・基質複合体より 4 ~ 6 倍速く産出物を生じる事が分かった。

チモロールはどの様に炭酸脱水酵素に結合し酵素活性を賦活化するかを検討する目的で、チモロールを炭酸脱水酵素 (HCA I) にドッキングシミュレーションした。その結果を Fig. 9 に示す。チモロールは炭酸脱水酵素の活性部位の cavity のすぐ外側に存在する His<sup>64</sup> 残基の近くに結合し、炭酸脱水酵素が酵素活性を発現するさいに、His<sup>64</sup> 残基が外部の水分子にプロトンを手渡す律速反応段階をチモロールが手助けする形で、炭酸脱水酵素の酵素活性を賦活化する事が分かった。

炭酸脱水酵素 HCA I の活性をチモロールが賦活化するメカニズムを Fig. 10 に示した。亜鉛イオンに結合した水分子は亜鉛イオンの Lewis の酸としての性質により活性化されプロトン



**Fig. 9 Autodock simulation of timolol acid-HCA I complex**

**A:** Most favorable interaction mode latanoprost free acid with HCA I (PDB code:1HUH) obtained from a docking simulation using AutoDock 3.0.5. The  $Zn^{2+}$  ion and timolol are shown as a sphere and a ball-stick model, respectively. The  $\alpha$ -helix and the  $\beta$ -sheet regions are shown as a ribbon model. In addition, timolo is nearly bound to His 64 which is the proton shuttle residue in HCA I.  
**B:** Most favorable interaction mode timolol with HCA I. HCA I and timolol are shown as a sphere model and a ball-stick model. Timolol locates at the entrance of the active site in HCA.

を遊離する。亜鉛イオンの第五番目に配位する二酸化炭素に、水分子からプロトンが取り去られた水酸基が攻撃し、炭酸イオンとなり産生物となる。水分子から遊離したプロトンは、活性部位の残基に手渡され、最終的に His<sup>64</sup> に結合する。His<sup>64</sup> に結合したプロトンは外部にある水分子や緩衝液中の塩基に渡されるが、この反応が HCA の反応の律速段階であると言われている。チモロールが存在すると His<sup>64</sup> の近くに結合し、チモロールは塩基としての性質を持つことから、プロトンを素早く受け取り酵素活性を賦活化すると思われる<sup>33-37</sup>。

以上の結果より、チモロールは炭酸脱水酵素の賦活化剤であるので、緑内障治療薬である炭酸脱水酵素阻害剤とチモロールを同時投与すると、炭酸脱水酵素阻害剤の効果が打ち消されてしまう可能性を示した。

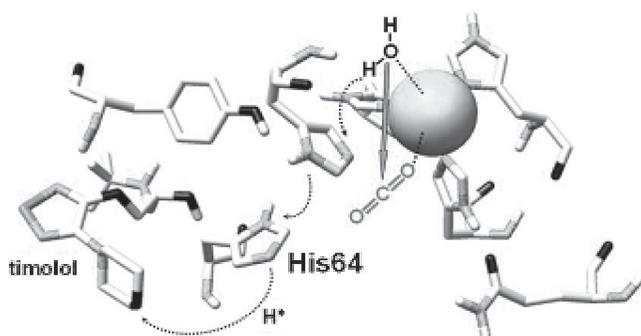


Fig. 10 Activation mechanism of timolol for hydration activity of carbodioxide in HCA I.

## 2. 計算化学による酵素及びその部位特異的変異体の立体構造予測

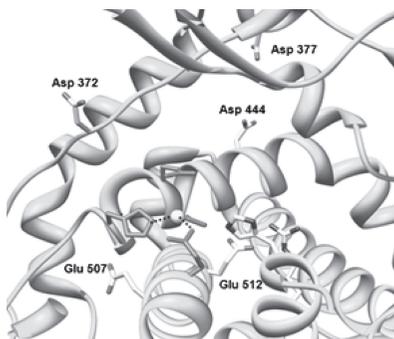
### 2-1 Rat-Dipeptidyl Peptidase III 中の残基 Glu<sup>507</sup> および Glu<sup>512</sup> は His 残基と亜鉛イオンの配位結合を安定化していた -計算化学による Rat-Dipeptidyl Peptidase III の立体構造の推定-<sup>5)</sup>

我々はアミノ末端からジペプチドを切り出す rat-Dipeptidyl Peptidase III (rat-DPP III) のアミノ酸配列を明らかにし、この酵素が通常の亜鉛結合モチーフ配列 (HEXXH..E) にもう一残基加わった新奇な亜鉛モチーフ配列 (HELLGH(450-455)) を持つ事を発見した<sup>38</sup>。Rat-DPP III は特にプラスに電荷した基質 Arg-Arg-β-naphthylamide(Arg-Arg-β-NA) に対して基質特異性が高い。

Rat-DPP III のこの新奇な亜鉛モチーフ配列に亜鉛イオンが結合しているかどうかを知るために、多くの部位特異的変異体を作成し、亜鉛イオン含量・酵素活性を測定した結果、亜鉛イオンには His<sup>450</sup> および His<sup>455</sup> そして Glu<sup>508</sup> が配位結合している事が分かった<sup>19-20</sup>。

亜鉛ペプチダーゼ中の亜鉛イオンは種々の遷移金属イオンに置き換える事が出来るが、普通の亜鉛モチーフ配列 (HEXXH) を持つ亜鉛ペプチダーゼ中の亜鉛イオンを銅イオンに置き

換えると、活性を失ってしまう。しかし、新奇な亜鉛モチーフ配列 (HELLGH(450-455)) を持つ rat-DPP III の銅イオン置換体は、天然の酵素の約 40% の酵素活性を示した<sup>19,20)</sup>。最近相次いで、yeast-DPP III および human-DPP III の X 線結晶構造解析がなされ、DPP III の立体構造が解明された。そこで human-DPP III (rat-DPP III とのアミノ酸配列相同性 94%) 立体構造に基づき、rat-DPP III の立体構造を計算化学で予測した。計算された rat-DPP III の活性部位の立体構造を Fig. 11 に示す<sup>39-42)</sup>。



**Fig. 11 Molecular modeling of catalytic cavity of rat DPP III. Model was generated as a template of the human DPP III X-ray structure. Zinc ion is showed as a sphere, catalytic amino acid residues as a stick (His<sup>455</sup>, His<sup>450</sup>, Glu<sup>451</sup>, and Glu<sup>508</sup>), and other related amino acid side chains as stick**

rat-DPP III の立体構造に基づいて、基質結合部位を知るために、活性部位付近に存在する負電荷を持った Glu および Asp を探すと、Asp<sup>372</sup>, Asp<sup>377</sup>, Asp<sup>444</sup>, Glu<sup>507</sup>, Glu<sup>512</sup> の残基が見出された。そこで、Glu(E) を同じ電荷を持つ Asp(D) 及び電荷のない Ala(A) に置き換えた部位特異的の変異体を作成し、基質 Arg-Arg-naphthylamide(Arg-Arg-NA) を用いて酵素活性を測定した。Asp 及び Glu を Ala に置き換えた場合、大きく酵素活性を低下させたのは、Asp<sup>444</sup>, Glu<sup>507</sup>, Glu<sup>512</sup> であった。そこでこれらの置換体の亜鉛含有量と酵素活性を測定し、その結果を Table 5 に示した。

Glu<sup>507</sup> と Glu<sup>512</sup> を Asp、Ala に部位特異的置換を行うと、酵素活性と酵素中の亜鉛含量が同時に大きく低下することが分かった。この結果より、Glu<sup>507</sup> と Glu<sup>512</sup> が亜鉛イオンの結合になんらかの影響を与えている事が推定された。Fig. 11 において Glu<sup>507</sup> と Glu<sup>512</sup> は亜鉛イオンに配位する His 残基の近くに存在する。His<sup>450</sup> 及び His<sup>455</sup> のイミダゾール環の窒素原子と Glu<sup>512</sup> と Glu<sup>507</sup> のカルボキシル基の距離を、rat-DPP III の立体構造において測ったところ 2.8 Å であり、水素結合している事が分かった。それゆえ、Glu<sup>507</sup> と Glu<sup>512</sup> は、亜鉛イオンに配位する His 残基と水素結合して、その配位構造を安定化させ亜鉛イオンに対する His 残基の配位結合能力を高めていることが分かった。

Fig. 12 において、Glu<sup>507</sup> には、Lys<sup>629</sup> と Arg<sup>510</sup> が水素結合しており、また Glu<sup>512</sup> には Asn<sup>446</sup>

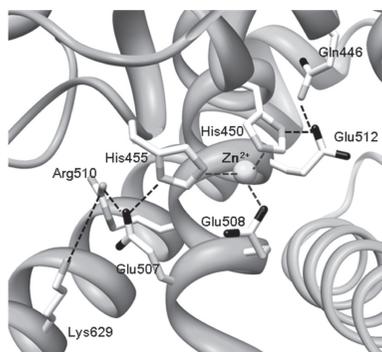
**Table 5 Zinc content and relative rate of hydrolysis for Arg-Arg-β-NA or Phe-Arg-β-NA of wild-type and mutated rat DPP IIIs**

DPP IIIs	Zinc Content (Mol/mol of protein <sup>a</sup> )	Relative rate of hydrolysis	
		Arg-Arg-β-NA % (μmol/mg of protein <sup>b</sup> )	Phe-Arg-β-NA % (μmol/mg of protein <sup>b</sup> )
Wild-type	1.02±0.15	100 (39.5±3.1)	100 (12.1±1.6)
D444E	0.81±0.13	66	95
D444A	0.82±0.11	24	11
E507D	0.65±0.07	38	8
E507A	0.29±0.04	4	0.9
E512D	0.45±0.06	49	47
E512A	0.08±0.01	3	3

<sup>a</sup> Values are means±SD (n=3)

<sup>b</sup> Values are means±SD of two separate preparations of the wild-type enzymes with duplicate determinations.

が水素結合しており、亜鉛イオンに配位する His<sup>450</sup> および His<sup>455</sup> の周りには水素結合ネットワークが形成されていた。この水素結合ネットワークは、亜鉛イオンに配位する His<sup>450</sup> および His<sup>455</sup> の構造を支えており、His<sup>455</sup>, His<sup>450</sup> のイミダゾール環の窒素原子が、亜鉛イオンに配位しやすいような方向を向かせる役割を担っていると思われる。それゆえ、Glu<sup>507</sup>、Glu<sup>512</sup> を部位特異的に変異すると His<sup>455</sup>, His<sup>450</sup> が不安定化されて亜鉛イオンに対する結合が弱くなるため、これらの部位特異的な変異体は亜鉛を解離してしまう可能性を示した。これを確定するために、Glu<sup>507</sup> および Glu<sup>512</sup> を Asp、Ala に部位特異的な変異した酵素中の亜鉛イオンの解離定数を測定し、その結果を Table 6 に示した。いずれの部位特異的な置換体も Glu を Asp に、さらに



**Fig. 12 Molecular modeling of catalytic sites of the wild-type rat DPP III**

The model was generated as a template of the human DPP III crystal structure. The zinc ion is shown as a sphere, and amino acid side chains are shown as sticks. Metal coordinates and hydrogen bonds are indicated by dashed lines.

Alaにするにつれて解離定数が大きくなる。これは Asp はカルボキシル基が存在し His 残基と水素結合する能力があるが、Ala にはそれが全く無いために、Ala 置換体はより大きい亜鉛イオンの解離定数を持つことが判った。

これら結果は、Glu<sup>507</sup> と Glu<sup>512</sup> のカルボキシル基が亜鉛イオンに配位する His<sup>450</sup> と His<sup>455</sup> のイミダゾール環の窒素に水素結合して、その配位構造を安定化させる事により、亜鉛イオンに対する His 残基の配位結合能力を高めている事を示した<sup>5)</sup>。

**Table 6 Zinc dissociation constants of various mutated DPP IIIs at pH 7.4**

Enzyme	Zinc dissociation constant (M)	Maximum activity (%) <sup>b</sup>
	( <i>K<sub>d</sub></i> )	( <i>V<sub>lim</sub></i> )
Wild-type	(4.5±0.1)×10 <sup>-13</sup> <sup>a</sup>	100
E507D	(1.0±0.2)×10 <sup>-11</sup>	111
E507A	(1.0±0.2)×10 <sup>-8</sup>	170
E512D	(1.4±0.1)×10 <sup>-12</sup>	111
E512A	(2.6±0.7)×10 <sup>-9</sup>	332

<sup>a</sup> from previous manuscript 9)

<sup>b</sup> The hydrolyzing activity of each mutated enzymes toward Arg-Arg-β-NA is 100%.

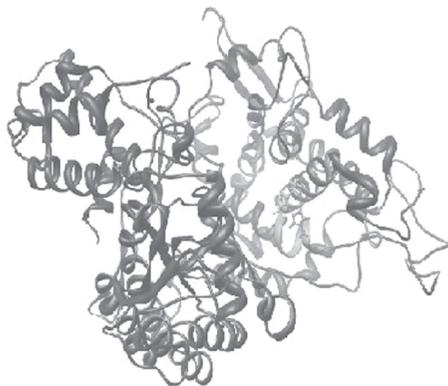
以上、この章では rat-DPP III の立体構造を human-DPP III の立体構造を参考に計算化学で組み立て、活性部位での水素結合ネットワークの重要性を示すことができた。しかし、基質である Arg-Arg-β-NA のアミノ末端と側鎖の正電荷を認識する酵素の残基はいまだ不明のままであり、現在ドッキングシミュレーションと部位特異的変異によりこれらの残基を特定しようと試みている。

## 2-2 Rat-Dipeptidylpeptidase III が基質と形成する酵素反応遷移中間体の構造の解明<sup>6)</sup>

新奇的な亜鉛結合モチーフ HELLGH を持つ rat-DPP III、及び特異な亜鉛結合モチーフの Leu<sup>453</sup> を1つ取り除き一般的な亜鉛結合モチーフ配列 (HELGH) にした rat-Leu<sup>453</sup>-delet-DPP III (rat-del-DPP III) はいずれも酵素活性を示す。しかし、これらの酵素中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換えると rat-Cu(II)-DPP III は天然の酵素の 40% 程度の活性を示すが、rat-Cu(II)-del-DPP III は完全に活性を消失する事を発見した<sup>19-20)</sup>。

human-DPP III の立体構造に基づき、Leu<sup>453</sup> を取り除いた rat-DPP III および rat-del-DPP III の立体構造をコンピュータ・シミュレーションにより推定したところ、ほぼ human-DPP III と同じ立体構造を示した。これを Fig. 13 に示す<sup>39-42)</sup>。

Rat-DPP III および rat-del-DPP III における亜鉛結合部位の立体構造の差異は、亜鉛結合モチーフ配列部分の α-ヘリックス部分に限られていた。これを Fig.14 a と b に示す。Fig. 14 の rat-DPP III と rat-del-DPP III の亜鉛結合部位の立体構造において、rat-DPP III の活性の発現に関与する His の直ぐ隣の Glu<sup>451</sup> は金属イオンに配位した水分子を活性化する事で、酵素活性発現

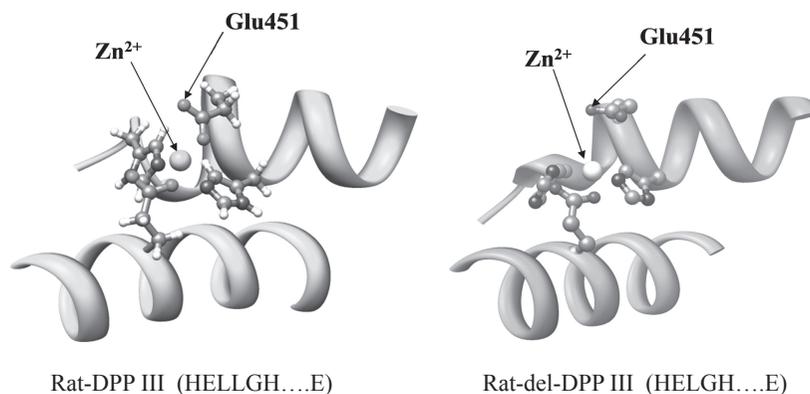


**Fig. 13 Molecular modeling of rat-dipeptidyl peptidase III(rat-DPP III)**

**The model was generated as a template of the human DPP III crystal structure. The mainchain was shown as a ribbon model.**

に参与する重要な残基である事が知られている。Fig. 14において、普通の大きさのヘリックスループを持つ rat-del-DPP III の Glu<sup>451</sup> に比べ、新奇な亜鉛結合モチーフ HELLGH を持つ rat-DPP III の Glu<sup>451</sup> は、大きなヘリックスループ上に存在するため、大きく亜鉛イオンに近づいていた。Rat-DPP III では亜鉛イオンと Glu<sup>451</sup> のカルボキシ基の酸素原子の距離は、3.9 Å であり、rat-del-DPP III では 4.9 Å であった。これは、rat-DPP III では Glu<sup>451</sup> が存在するヘリックス部分が 5 残基で一回転する異常なヘリックス部分となり、Glu<sup>451</sup> が亜鉛イオンに近づきやすくなるためと思われる。この点が DPP III と del-DPP III の立体構造の大きな差異であった。

この立体構造の差異が、基質との結合にたいしてどの様に影響するかを検討する目的で、ミカエリス型の反応中間体を捉えやすくするために  $k_{cat}$  が小さい基質である Lys-Ala- $\beta$ -naphthylamide(Lys-Ala- $\beta$ -NA) を選択し、rat-DPP III 中の亜鉛イオンを銅 (II) イオンに置換した rat-Cu(II)-DPP III を用いて反応を追跡した。種々の濃度の基質 Lys-Ala- $\beta$ -NA を rat-Cu(II)-DPP III に加えて直ちに凍結させ、電子スピン共鳴スペクトルを測定した。Lys-Ala-NA の濃度を増加させるにつれて、rat-Cu(II)-DPP III の EPR スペクトルは大きく変化した。この事は、基質である Lys-Ala-NA が、rat-Cu(II)-DPP III 中の銅イオンの配位構造を大きく変化させる事を示している。一方、亜鉛イオンを銅 (II) イオンに置換した rat-Cu(II)-del-DPP III に十分量の基質である Lys-Ala-NA を加えても (基質濃度は、活性を示す rat-del-DPP III の  $K_m$  値より決定)、その EPR スペクトルは全く変化しなかった。以上に示すように rat-Cu(II)-DPP III の銅イオン配位構造は非常に flexible であるのに対し (配位構造が変化する)、rat-Cu(II)-del-DPP III 中の銅イオンの配位構造は非常に rigid (配位構造が固定化している) である事が分かった。これは rat-del-DPP III に比べ、rat-DPP III が大きなヘリックスループを持つためであると考えられる。



**Fig. 14 The comparison between the zinc binding site of rat-DPP III and rat-del-DPP III**  
**The model was generated as a template of the human DPP III crystal structure. The main chain and the residues were shown as a ribbon model and a ball-stick model, respectively. The zinc ion is shown as a space fill model.**

#### 謝辞

これらの研究の遂行にあたり、多くの討論と示唆をして頂いた薬学部・薬品物理化学研究室の小野行雄教授に深く感謝致します。また、この研究のテーマの切っ掛けを作って頂いた京都大学農学部名誉教授 故廣海啓太郎先生、及び酵素に対する金属結合定数の測定の基礎を教えて頂いた名古屋市立大学薬学部名誉教授 故喜谷喜徳先生に深く感謝致します。

#### REFERENCES

- 1) Fukasawa, K. M., Hirose, J., Hata, T., Ono, Y., *Biochemistry*, **45**(38), 11425-11431 (2006).
- 2) Hirose, J., Ohsaki, T., Nishimoto, N., Matuoka, S., Hiromoto, T., Yoshida, T., Minoura, T., Iwamoto, H., and Fukasawa, K. M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(12), 2378-2382 (2006).
- 3) Sugimoto, A., Ikeda, H., Tsukamoto, H., Kihira, K., Takeda, C., Hirose, J., Hata, T., Baba, E., Ono, Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(5), 796-801 (2008).
- 4) Sugimoto, A., Ikeda, H., Tsukamoto, H., Kihira, K., Ishioka, M., Hirose J., Hata, T., Fujioka H., Ono, Y., *Biol. Pharm. Bull.* **33**(2), 301-306 (2010).
- 5) Fukasawa, K. M., Hirose, J., Hata, T., Ono, Y., *Biochim. et Biophys. Acta*, **1804** (10), 2063-2069 (2010).
- 6) Hirose, J., The EPR spectra of the Enzyme-Substrate (Lys-Ala-β-Naphthylamide) Complex in Cu(II)-Dipeptidyl Peptidase III. 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (July 15-20, Vienna, Austria) *J. Biol. Inorg. Chem.* (2007) 12(1), S-57, submitted for publication.
- 7) Fukasawa, K. M., Hirose, J., Hata, T., Ono, Y., The 3D structure and metal preferences of unique zinc-binding motif HExxGH-52aa-E in dipeptidyl peptidase III (family M49). *Journal of Amino*

*Acids*, submitted for publication.

- 8) Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Kanai, M., Fujii S., and Harada, M., *J. Biol. Chem.* **271**, 30731-30735 (1996).
- 9) Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Harada, M., Hirose, J., Izumi, T., and Shimizu, T., *Biochem. J.* **339**, 497-502 (1999).
- 10) McDonald, J. K., and Barrett, A. J. (1986) in *Mammalian Proteases* (McDonald, J. K., and Barrett, A. J., eds) vol. 2, pp. 48-55, Academic Press, Inc., London
- 11) Thunnissen, M. M. G. M., Nordlund, P., and Haeggström, J. Z., *Nature Str. Biol.* **8**, 131-135 (2001).
- 12) Makita, N., Funk, C. D., Imai, E., Hoover, R.-L., and Badr, K. F., *FEBS Lett.* **299**, 273-277 (1992).
- 13) Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C., *Biochem. J.* **334**, 407-413 (1998).
- 14) Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B. P., and Fournie-Zaluski, M.-C., *Biochemistry* **37**, 686-692 (1998).
- 15) Rudberg, P. C., Tholander, F., Thunnissen, M. M. G. M., and Haeggström, J. Z., *J. Biol. Chem.* **277**, 1398-1404 (2002).
- 16) Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J., *J. Comput. Chem.*, **19**, 1639-1662 (1998).
- 17) <http://www.scripps.edu/%7Esanner/python/index.html>
- 18) Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. and Stewart, J. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).
- 19) 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., *Biochemistry* **40**, 11860-11865 (2001).
- 20) Hirose, J., Kamigakiuchi, H., Iwamoto, H., Fujii, H., Nakai, M., Takenaka, M., Kataoka, R., Sugahara, M., Yamamoto, S., and Fukasawa, K. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **431**, 1-8 (2004).
- 21) Bertini, I., Canti, G., Kozlowski, H., and Scozzafava, A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1270-1273 (1979).
- 22) Rosenberg, R.C., Root, C.A., Bernstein, P. K. and Gray, H. B., *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2092-2096 (1975).
- 23) Tsukamoto, H., Noma, H., Matsuyama, S., Ikeda H., Mishima, H.K., *J Ocul Pharmacol Ther.* **21**, 170-173 (2005).
- 24) Tsukamoto, H., Noma, H., Matuyama, S., Ikeda, H. and Mishima, H.K., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **21**, 395-399 (2005).
- 25) Khalifah, R.G., *J. Biol. Chgem.* **246**, 2561-2573 (1971).
- 26) Kumar, V., Kannan, K. K., Sathyamurthi, P., *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, **D50**, 731-738 (1994).

- 27) Sanner, M. F., *J. Mol. Graphics Mod.*, **17**, 57-61 (1999).
- 28) Pocker, Y., Deits, Thomas, L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 2424-34 (1982).
- 29) Tibell, L., Forsman, C., Simonsson I., Lindskog, S. *Biochim. et Biophys. Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, **789**, 302-10 (1984).
- 30) Jöensson, B. M., Håkansson, K., Liljas, A., *FEBS Letters*, **322**, 186-190 (1993).
- 31) Cornish-Bowden, A., "Fundamentals of Enzyme Kinetics," Butterworth & Co., London, 1981
- 32) Hiromi, K. "Introduction to Enzyme Chemistry," eds. by Nishizawa K., Shimura K., Nankodo, Tokyo, 1995, pp. 21-92
- 33) Supuran, C.T., *Nature*, **7**, 168-181 (2008)
- 34) Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Scozzafava, A., Kaila, K., and Supuran, C.T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 4107-4112 (2007)
- 35) Briganti, F., Mangani, S., Orioli P., Scozzafava, A., Vernaglionone, G., and Supuran, C. T., *Biochemistry*, **36**, 10384-10392 (1997)
- 36) Scozzafava, A. and Supuran, C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1177-1180 (2002)
- 37) Temperini, C., Scozzafava, A., Puccetti, L., and Supuran, C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 5136-5141 (2005)
- 38) Fukasawa, K., Fukasawa, K.M., Kanai, M., Fujii, S., Hirose, J., and Harada, M. *Biochem. J.* **329**, 275-282 (1998).
- 39) Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Crowley, M., Walker Ross, C., Zhang, W., Merz, K. M., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V., and Kollman, P. A. (2008), AMBER 10, *University of California, San Francisco*.
- 40) Onufriev, A. and Bashford, D. Case, D.A., *J. Phys. Chem. B*, **104**, 3712-3720 (2000).
- 41) Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee M.C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., and Lee, T., *J. Comput. Chem.* **24**, 1999-2012 (2003).
- 42) Lee, M.C., and Duan, Y., *Proteins*, **55**, 620-634 (2004).