

亜鉛を含む酵素, タンパク質に関する研究: 現状と展望

原田 奈波¹⁾, 老川 典夫^{1,2)†}

(¹⁾関西大学大学院理工学研究科化学生命工学専攻, (²⁾関西大学化学生命工学部生命・生物工学科)

(受付 2023年8月28日, 受理 2023年10月5日)

Studies on zinc-containing enzymes and proteins: current status and prospects

Nanami HARADA¹⁾, Tadao OIKAWA^{1,2)}

¹⁾Chemistry, Materials and Bioengineering Major, Graduate School of Science and Engineering, Kansai University*

²⁾Department of Life science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University*

Summary

Zinc is one of the essential micronutrients for all organisms, including microorganisms, plants, and animals. There are more than 300 zinc enzymes that use zinc as a cofactor, and zinc is thought to be required for enzyme activity, structural maintenance, and function as a signaling factor. Some zinc enzymes have been characterized in detail, including the structure around the zinc, which generally forms a tetrahedral structure in which His, Glu, Asp, and Cys bind to the zinc and activate it. Zinc enzymes are valuable therapeutic targets because they exhibit important physiological functions, and the development of drugs and inhibitors has been investigated. However, the function, crystal structure, and chemistry of many zinc enzymes remain unexplored.

In this mini-review, we describe the distribution of zinc-containing enzymes and proteins and their reaction mechanisms, the role of zinc, and its pharmaceutical and therapeutic applications to clarify the important points to be clarified in this research area.

1. はじめに

亜鉛 (Zn) は、微生物や植物、動物などのあらゆる生物にとって必須微量元素であり^{1,2)}、ヒトの体内では鉄の次に含有量が多い²⁾。また亜鉛は、チオールヘメチル基を転移する反応を触媒する酵素などヒトでは 300 種類以上の酵素の補因子として同定されており、典型元素の中でも補因子としての存在割合が高い^{3,4)}。亜鉛を補因子として機能する亜鉛含有酵素 (亜鉛酵素) は、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、合成酵素の 6 種の酵素の大分類のいずれの分類にも存在する⁵⁾。これまでに報告されている代表的な亜鉛酵素には、カーボニックアンヒドラーゼ⁶⁾、カルボキシペプチダーゼ⁷⁾、アルコールデヒドロゲナーゼ⁵⁾等がある (Table 1)。

これらの亜鉛酵素の多くは、亜鉛が活性中心に存在し、酵素の触媒作用に必須であることが報告されている⁸⁾。一方で、一部の亜鉛酵素では、亜鉛が活性中心に存在せず酵

素の構造維持に寄与するものも存在する⁵⁾。例えば、ウマ肝臓のアルコールデヒドロゲナーゼはホモダイマーであり、サブユニットあたり 2 原子の亜鉛が含まれているが、これらはそれぞれ酵素活性 (活性亜鉛) と構造維持 (構造亜鉛) の別々の機能を有していると報告されている亜鉛酵素である⁹⁾。また、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼは構造維持に寄与する亜鉛原子のみを含むと報告されている亜鉛酵素である¹⁰⁾。このように、酵素分子内に存在する亜鉛は、酵素 (タンパク質) に結合することで個々の生理的機能を発揮している。これまでにいくつかの亜鉛を含む酵素やタンパク質について、高次構造や亜鉛結合部位の構造とこれらに基づく反応機構などが明らかにされている^{2,9)}。しかし、既存の亜鉛を含む酵素やタンパク質の中には未だ亜鉛の結合状態やその存在意義が解明されていないものも多く存在する¹¹⁾。そこで本稿では、亜鉛を含む酵素やタンパク質に焦点を当て、これまでの報告に基づいて概説するとともに今後の展望について述べる。

† Corresponding author : E-mail: oikawa@kansai-u.ac.jp Tel.: +81-6368-0812

* Address: 3-3-35 Yamate-Cho, Suita-Shi, Osaka-Fu 564-8680, Japan

2. X線結晶構造解析に基づく 亜鉛原子の結合様式と機能

これまでにX線結晶構造解析に基づき立体構造が決定されている代表的な亜鉛酵素をTable 2にまとめた。

これらの立体構造情報に基づき、亜鉛酵素にはさまざまな亜鉛結合様式が存在することが明らかとなっている。中でも最も一般的な亜鉛結合様式は、アルカリフォスファターゼ (Fig. 1 A), カルボキシペプチダーゼ (Fig. 1 A),

炭酸脱水酵素 (Fig. 1B), アルコールデヒドロゲナーゼ (Fig. 1 C) のように、亜鉛原子の4つの配位子のうち3つが酵素を構成するアミノ酸残基の側鎖であり、これらの配位結合を介して亜鉛原子はタンパク質骨格に結合し、4つ目の亜鉛原子の配位子を水分子が占有することによって四面体構造を形成する²⁾ (Fig. 1)。亜鉛イオンを含むタンパク質の結晶構造の解析によると、通常四面体、三方晶双錐体、八面体構造を形成するが、四面体構造が好ましいことが明らかとなっている²⁹⁾。ジンクフィンガータンパク質は、

Table 1 Representative zinc enzymes previously reported

Protein/Enzyme	Organism	Zn content (mol/mol)	Accession no.	Reference
Carbonic anhydrase III	<i>Bos taurus</i> (Bovine)	1	Q3SZX4	31
Carbonic anhydrase	<i>Pisum sativum</i>	6	P17067	32
Carboxypeptidase	<i>Pseudomonas sp.</i>	1	P06621	33
Alcohol dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	P32771	34
Alkaline phosphatase	<i>Escherichia coli</i>	2	P00634	35
Aspartate transcarbamoylase	<i>Escherichia coli</i>	6	P0A786	36
Aminopeptidase RNPEPL1	<i>Homo sapiens</i>	1	Q9HAU8	37
Rhamnulose-1-phosphate aldolase	<i>Escherichia coli</i>	2	P32169	38
Dipeptidase	<i>Sus scrofa</i> (pig)	1	P22412	39
Pyruvate carboxylase 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	P32327	40
Mercaptopyruvate sulfurtransferase	<i>Escherichia coli</i>	1	P31142	41

*The data in this table were in part cited from reference⁶⁾.

Table 2 Representative crystal structure of zinc enzymes previously reported

Enzyme classification	Enzyme	PDB no.	Reference
Oxidoreductase	Alcohol dehydrogenase	4EEX	42
		5VJ5	43
		1Y9A	44
Transferase	Aspartate carbamoyltransferase	1I5O	45
		2BE9	46
Hydrolase	Carboxypeptidase A	6CPA	47
	Carboxypeptidase B	2JEW	48
	DD carboxypeptidase	4MUS	49
	Thermolysin	6LZN	50
	<i>Bacillus cereus</i> neutral protease	1ESP	51
	β -Lactamase	2BMI	52
	Alkaline phosphatase	1HQA	53
	Phospholipase C	1AH7	54
Lyase	Carbonic anhydrase I	1BZM	55
	Carbonic anhydrase II	1HEA	56

*The data in this table were in part cited from reference¹³⁾.

亜鉛イオンの結合によってドメイン構造を形成する代表的な構造モチーフである。亜鉛イオンと結合する配位子アミノ酸であるシステイン残基とヒスチジン残基を有しており、四面体構造を形成し亜鉛イオンが結合している²⁸⁾。

この亜鉛原子に結合した水分子は、イオン化、置換、活性部位のアミノ酸の分極によって活性化される¹⁰⁾。このような結合様式でタンパク質に結合している亜鉛は、ペプチド結合のカルボニル炭素、二酸化炭素の炭素、またはリン酸エステルのリンを攻撃し、配位している水分子を活性化するのに適した状態にある¹²⁾。また、亜鉛原子の配位子となりタンパク質に亜鉛原子を結合するアミノ酸残基は、側鎖が窒素、酸素、硫黄の供与体となる His, Glu, Asp, Cys であり、これらのアミノ酸残基の組み合わせが亜鉛酵素によって異なる²⁾。これらのアミノ酸は、亜鉛原子だけでなく亜鉛以外の金属原子の配位子としても機能し、His >> Glu > Asp = Cys の順で配位金属に対する結合定数が大きい¹⁰⁾。活性中心に存在する亜鉛結合部位では、2つの配位子となる側鎖を有するアミノ酸残基 (リガンド)

は、1-3個のアミノ酸残基から成る短いスペーサーによって分離されており、この短いスペーサーの存在によって二座亜鉛錯体の形成が可能となる¹⁴⁾。一方、3つ目のリガンドは20-120個のアミノ酸残基から成る長いスペーサーによって分離されており、亜鉛原子に対する配位圏を広げたり配位子を交換したりすることによって、亜鉛原子の配位圏に柔軟性をもたらす。その結果、亜鉛酵素の活性中心に存在する亜鉛は安定化し、基質と混合錯体を形成し、さまざまな触媒作用を発揮することができる^{12, 14)}。さらに、この長いスペーサー領域には、基質の結合などの酵素の触媒過程に関与するさまざまなアミノ酸残基を適切に配置することができ、その結果活性中心の立体構造を維持することによって酵素に触媒能をもたらす立体構造を保持させるのに役立つ可能性がある¹²⁾。このように、亜鉛結合部位のリガンド間のスペーサーの長さは、亜鉛酵素の基質特異性や触媒能等に影響を与える可能性があると考えられており、これらのスペーサーの長さや配列に着目した *in silico* 解析を行うことによって、機能が不明な亜鉛を含む酵素やタンパク質の機能予測や、これらの情報に基づく変異の導入により、亜鉛を含む酵素やタンパク質の機能改変が可能になることが期待される。

また、四面体構造中の亜鉛原子の4つの配位子が全てシステイン残基のチオール基である亜鉛酵素もあり、このような結合様式を有するタンパク質中の亜鉛原子は一般に構造維持に関与すると考えられている¹³⁾。例えば、上述のウマ肝臓のアルコールデヒドロゲナーゼの構造亜鉛は、亜鉛原子に Cys97, Cys100, Cys103, Cys111 の4つのシステイン残基の硫黄原子が四面体状に強固に結合している¹⁵⁾。このような亜鉛原子には、容易に溶媒と置換することができる配位座がなく、また分子の表面近くに存在するため触媒活性には寄与せず、局所的なタンパク質の折り畳みや立体構造の形成や制御に関与すると考えられている¹³⁾。しかしながら、構造亜鉛がタンパク質間相互作用を調節できるか等、詳細な機能については未だ解明されておらず、今後の解明が期待される。

さらに Rowena G Matthews らは、中性条件下でコバラミン非依存性メチオニンシンターゼの基質ホモシステインのチオール基が活性中心に存在する亜鉛原子に配位していることを報告し、亜鉛酵素における亜鉛の新たな役割を報告した³⁾。また、大腸菌の Ada タンパク質は、亜鉛原子が4つのシステイン残基の硫黄原子に結合しているにも関わらず、このうち1つのシステイン残基のチオール基が活性化されることが報告された³⁾。

一般に、亜鉛原子のリガンドとなる4種類のアミノ酸 (His, Asp, Glu, Cys) の側鎖は単結合でありその柔軟性により自由に回転できるため、亜鉛を含む酵素やタンパク質中の亜鉛の結合に柔軟性をもたらす¹⁴⁾。この亜鉛結合の柔軟性は、酵素やタンパク質の構造や機能など基本的な性質に影響を与える。このことが亜鉛を含む酵素やタンパク質に多様性をもたらすため、反応機構等の解明の大きな

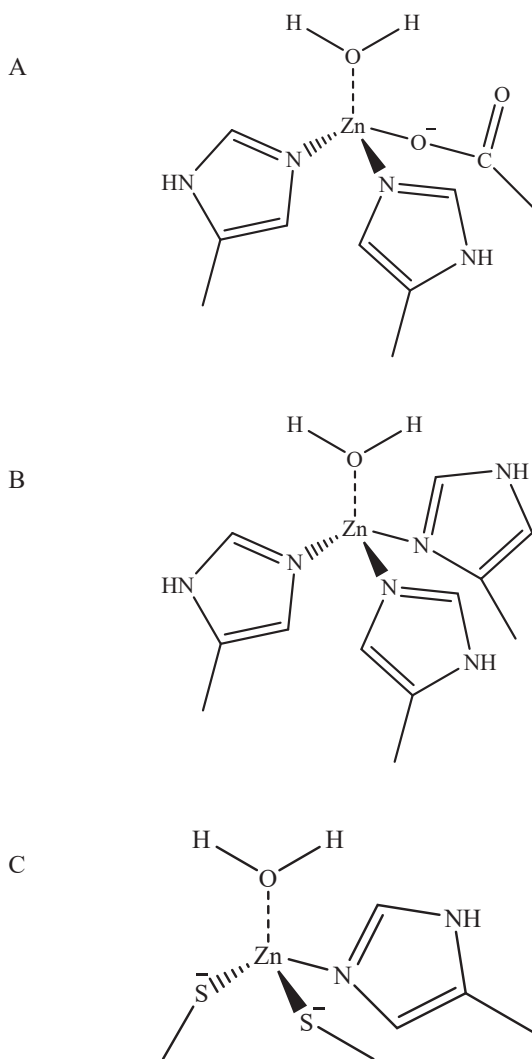


Fig. 1 General zinc-binding mode of zinc enzymes
 A Alkaline phosphatase, Carboxypeptidase
 B Carbonic anhydrase
 C Alcohol dehydrogenase

障壁となっているが、その結果、未解明な重要な興味深い研究課題がこの研究フィールドには残されている。したがって、類似した構造をもつ亜鉛酵素であっても亜鉛の配位様式等を詳しく解析してみると、それぞれ特異な機能を有し、大きく異なる性質を持つ可能性が十分にあると考えられ、今後このような見地に立って亜鉛を含む酵素やタンパク質の亜鉛の機能を解明することが重要である。

3. 亜鉛の貯蔵や輸送に関与するタンパク質

亜鉛は、酵素やタンパク質の構造維持や酵素活性発現に関与するだけではなく、細胞内外の濃度変化を介して細胞内情報伝達を調節するシグナル因子として機能する微量元素である¹⁶⁾。細胞内のシグナル伝達は生存する上で必須なシステムであり、それが破綻すると癌化等を引き起こすと考えられている¹⁷⁾。近年、亜鉛がT細胞のシグナル伝達に関与していることが報告された¹⁷⁾。亜鉛は元素状または2価の陽イオンの状態で存在しているため、細胞膜を自由に通過することができない¹⁸⁾。そのため、亜鉛は細胞内外および細胞内小胞器内外には亜鉛トランスポーターによって輸送されていることが明らかになっている¹⁸⁾。亜鉛トランスポーターは、細胞質の亜鉛濃度を減少させる方向に亜鉛を輸送する Zn transporter (ZNT) ファミリーと、細胞質の亜鉛濃度を増加させる逆方向に輸送を行う Zn/Irt-like protein (ZIP) ファミリーの2種類が存在し、合わせて20種類以上の亜鉛トランスポーターが存在することが明らかにされている^{16, 18)}。この経路中には亜鉛酵素も多く存在しており、アポ酵素は亜鉛トランスポーターによって輸送された亜鉛を受け取り、活性を有するホロ酵素へと変換される¹⁶⁾。ZNTの大腸菌ホモログである YiiP のX線結晶構造解析の結果から、YiiPの亜鉛結合部位にはヒスチジン残基とアスパラギン酸残基が存在することが明らかとなり、単量体当たり4つの亜鉛結合部位を持つことが明らかとなった²⁶⁾。また、ZIPも二量体を形成しており、亜鉛イオン結合部位が存在する²⁷⁾。さらに、すべての真核生物や動物にはメタロチオネインと呼ばれる金属結合タンパク質が存在する¹⁹⁾。ヒト由来のメタロチオネインは、CysがC末端に11残基、N末端に9残基含まれており、7個の亜鉛が結合することが報告された¹⁹⁾。これらのトランスポーターによる亜鉛の輸送制御とメタロチオネインに

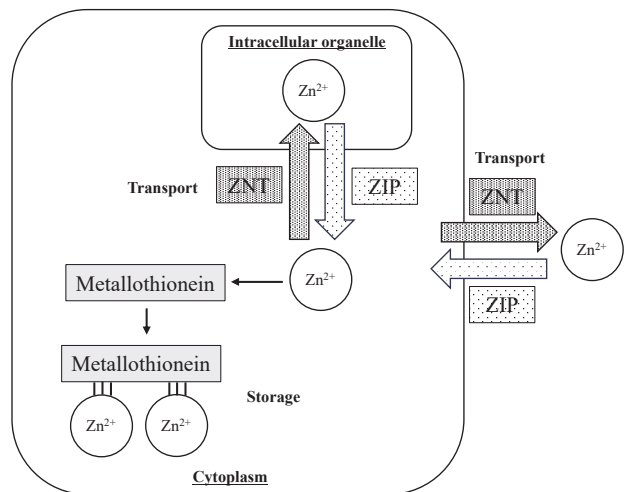


Fig. 2 Schematic diagram of intracellular zinc transport and storage in eukaryotes
ZIP: Zn/Irt-like protein family protein
ZNT: Zn transporter family protein

よる亜鉛貯蔵によって細胞内の亜鉛濃度が一定に保たれている¹⁹⁾(Fig. 2)。

このように亜鉛トランスポーターは重要な分子であるが、詳細な作用機序が十分に解明されていないものも多く存在し^{18, 19)}、また亜鉛トランスポーターの変異が原因で致死性不整脈、2型糖尿病等の重篤な疾患を引き起こす例も存在する¹⁸⁾。今後、数多く存在する亜鉛トランスポーターのメカニズムを解明することや機能を解析することは、さまざまな疾患の治療法の開発に貢献することが期待される。

4. 亜鉛酵素の医療や医薬品への応用

上述のように、亜鉛は生物体内に存在する亜鉛酵素の補因子として重要な元素である。したがって、亜鉛が欠乏した場合、ヒトでは味覚障害、皮膚炎、免疫機能低下、慢性肝疾患、糖尿病などの様々な病気に罹患する⁵⁾。したがって、亜鉛酵素はヒトの体内で多種多様な重要な生理的機能を有しており、病気を治療するための絶好の標的となる²⁰⁾。そのため、近年、医薬品や阻害剤を開発するために多くの亜鉛酵素が研究されている。実際、病気を治療するために、いくつかの亜鉛酵素を利用した様々な治療薬が販売されている。これまでに治療薬として市販されている亜鉛酵素をTable 3にまとめた。

Table. 3 Zinc enzymes used as therapeutic agents

Zn enzyme	Health benefit	Reference
Carbonic anhydrase	Inhibition of convulsion	22
Histone deacetylase	Inhibition of proliferation of tumor	20
Angiotensin converting enzyme	Inhibition of high blood pressure	20
Phosphodiesterase 4	Improvement of skin manifestation	20
Matrixmetalloproteinase	Inhibition of proliferation of tumor	20

*The data in this table were in part cited from reference^{20, 22)}.

例えば、亜鉛酵素であるカーボニックアンヒドラーゼ (CA) は、原核生物および真核生物に存在し、CA 阻害剤は緑内障、けいれん、てんかん、癌など様々なヒトの疾患の治療に役立つと報告されている²⁰⁾。CA は様々な疾患を治療するための重要な研究対象であるため、治療薬の開発においてますます重要性が高まっている²⁰⁾。しかし、ヒトの亜鉛酵素の多くは結晶構造などの研究が十分にされておらず、他の疾患への関連は未解明であり、構造に基づいた薬剤開発は十分には行われていない²⁰⁾。したがって、望まない副作用を引き起こす可能性がある²⁰⁾。そこで、亜鉛酵素のアロステリック部位に結合する阻害剤を利用した医薬品は優れた選択性を持つ可能性があるため、亜鉛酵素のアロステリック部位を同定することが選択性の高い阻害剤を発見することに繋がると考えられる²⁰⁾。また、近年では、CA 阻害剤が抗感染薬として機能することが期待されており、新しい抗生物質、抗真菌薬を開発するのに有望であると考えられている³⁰⁾。アンジオテンシン変換酵素は、デカペプチドアンジオテンシン I をオクトペプチドアンジオテンシン II に変換する。そのため ACE 阻害剤は、血管の弛緩および血液量の減少をもたらすため、高血圧、心不全、糖尿病性腎症、および 2 型糖尿病などの心血管疾患の治療に広く使用されている²⁰⁾。また、創薬標的として、原核生物の亜鉛酵素に関する研究も行われている²¹⁾。たとえば、一般的な人獣共通感染症であるブルセラ症を引き起こす通性嫌気性細胞内寄生性のグラム陰性小桿菌 *Brucella* 属菌の亜鉛酵素であるヒスチジノールデヒドロゲナーゼが、抗 *Brucella* 属菌の創薬標的として機能することが報告されている²¹⁾。以上のように、亜鉛酵素を用いた医薬品や、亜鉛酵素を創薬標的とした医薬品は、治療薬として実用化例が増加しつつある。今後様々な亜鉛を含む酵素やタンパク質についての構造や機能、酵素科学的性質を詳細に明らかにすることにより、有用な亜鉛酵素関連医薬品の開発が進展することが期待される。

5. おわりに

当研究室ではこれまで、亜鉛を含むユニークあるいは新規な酵素として、*Arthrobacter* sp. KUJ8602 由来の D-アルギナーゼ²³⁾、*Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 由来の好冷性耐熱性アルコールデヒドロゲナーゼ²⁴⁾、*Rhizobium* sp. strain MTP-10005 由来の新規 γ -レゾルシン酸デカルボキシラーゼ²⁵⁾ を発見し、これらの亜鉛酵素の酵素科学的性質や立体構造を明らかにしている。今後、さらに本稿で述べた研究対象として魅力的な未解明な亜鉛酵素に着目し、その酵素科学的性質、立体構造、反応機構等を明らかにしていきたいと考えている。

文 献

1) Martin R Broadley, Philip J White, John P Ham-

mond, Ivan Zelko, Alexander Lux / Zinc in plants / *New Phytologist*, 173, 4, 677-702, (2007)

2) Michael Hambidge / Human zinc deficiency / *The Journal of Nutrition*, 130, 5, 1344-1349, (2000)

3) Rowena G Matthews, Celia W Goulding / Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols : the role of zinc / *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 3, 332-339, (1997)

4) Wolfgang Maret / New perspectives of zinc coordination environments in proteins / *Inorganic Biochemistry*, 111, 110-116, (2012)

5) Kazuko Matsumoto, Keiichiro Fuwa / Zinc enzymes - with the emphasis on alcohol dehydrogenase - / *有機化学合成* / Vol. 39, No. 11, 1053-1061, (1981)

6) Dalila Jacqueline, Escudero Almanza, Damaris Leopoldina Oieda Barrios, Ofelia Adriana Hernandez Rodriguez, Esteban Sanchez Chavez, Teresita Ruiz Anchondo, Juan Pedro Sida Arreola / Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology / *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72, 1, 140-146, (2012)

7) Florante A Quioco, Wiliam N Lipscomb / Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme / *Advances in Protein Chemistry*, 25, 1-78, (1971)

8) Lothar Rink, Philip Gabriel / Zinc and the immune system / *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 541-552, (2000)

9) David E Drum, JH Harrison 4th, Ting Kai Li, JL Bethune, Bert Vallee / Structural and functional zinc in horse liver alcohol dehydrogenase / *National Academy of Sciences*, 57, 5, 1434-1440, (1967)

10) Bert L. Vallee, David S. Auld / Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis / *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7, 2715-2718, (1993)

11) 木村栄一 / 亜鉛酵素中の亜鉛の役割 / *化学と生物* / Vol. 30, No. 8, (1992)

12) Joseph E Coleman / Zinc enzymes / *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2, 2, 222-234, (1998)

13) Bert L. Vallee, David S. Auld / Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins / *Perspectives in Biochemistry*, 29, 24, 5647-5659, (1990)

14) Bert L. Vallee, David S. Auld / Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes / *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1, 220-224, (1990)

15) Eklund H, Nordstroem B, Zeppezauer E, Soederlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Soederberg B O,

- Tapia O, Braende C I, Akeson A / Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution / *Journal of Molecular Biology*, 102, 1, 27-59, (1976)
- 16) Taiho Kambe / Zinc transporters localized to the secretory pathway – involvement in the activation of zinc-requiring enzymes – / *Biomedical Research on Trace Elements*, 21, 1, 25-31, (2010)
- 17) Masanari Taniguchi, Shuichi Enomoto, Makoto Hiromura / The Regulation of the Activation in BCR Signaling by ZIP9 Transporter / *The Pharmaceutical Society of Japan*, 134, 7, 809-812, (2014)
- 18) 神戸 大朋 / 健康維持に不可欠なミネラル・亜鉛の機能を探る – 必須ミネラル亜鉛の機能を探る – / *日本農芸化学会*, 60, 1, 22-29, (2022)
- 19) Farzana Haq, Meghan Mahoney, James Koropatnick / Signaling events for metallothionein induction / *Mutation Research*, 533, 1-2, 211-226, (2003)
- 20) Rui Hou, Yan He, Guangwei Yan, Shuzeng Hou, Ahouling Xie, Chenzhong Liao / Zinc enzymes in medicinal chemistry / *Medicinal Chemistry*, 226, 113877, (2021)
- 21) Marie Lopez, Stephan Kohler, Jean Yves Winum / Zinc metalloenzymes as new targets against the bacterial pathogen *Brucella* / *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 138-145, (2012)
- 22) 諏訪 邦夫 / 炭酸脱水酵素阻害薬の臨床 / *日本臨床麻酔学会誌*, 9, 1, 43-50, (1989)
- 23) Noriaki Arakawa, Motoki Igarashi, Takayuki Kazuoka, Tadao Oikawa, Kenji Soda / D-Arginase of *Arthrobacter* sp. KUJ 8602: characterization and its identity with Zn²⁺-guanidinobutyrase / *The Journal of Biochemistry*, 133, 33-42, (2003)
- 24) Takayuki Kazuoka, Tadao Oikawa, Ikuo Muraoka, Shun'ichi Kuroda, Kenji Soda / A cold-active and thermostable alcohol dehydrogenase of a psychrotolerant from Antarctic seawater, *Flavobacterium frigidimarum* KUC-1 / *Extremophiles*, 11, 257-267 (2007)
- 25) Masaru Goto, Hideyuki Hayashi, Ikuko Miyahara, Ken Hirotsu, Masahiro Yoshida, Tadao Oikawa / Crystal structure of nonoxidative zinc-dependent 2,6-dihydroxybenzoate (γ -resorcyate) decarboxylase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 / *The Journal of Biochemistry*, 281, 34365-34373 (2006)
- 26) 福中 彩子, 神戸 大朋 / 亜鉛トランスポーター ZnT と ZIP の亜鉛輸送機構 / *生化学*, 82, 1, 30-34 (2010)
- 27) 神戸 大朋 / 健康維持に不可欠なミネラル・亜鉛の機能を探る 必須ミネラル亜鉛の機能を探る / *化学と生物*, 60, 1, 22-29 (2022)
- 28) 今西 未来 / 人口 DNA 結合タンパク質のデザインと細胞機能制御への展開 / *薬学雑誌*, 132, 12, 1431-1436 (2012)
- 29) Michael W. Thompson / Regulation of zinc-dependent enzymes by metal carrier proteins / *BioMetals*, 35, 187-213 (2022)
- 30) Claudiu T. Supuran / A simple yet multifaceted 90 years old, evergreen enzyme: Carbonic anhydrase, its inhibition and activation / *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 93 (2023)
- 31) P Engberg, E Millqvist, G Pohl, S Lindskog / Purification and some properties of carbonic anhydrase from bovine skeletal muscle / *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 241, 2, 628-638 (1985)
- 32) Matthew S. Kimber, Emil F. Pai / The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases / *The EMBO Journal*, 19, 1407-1418 (2000)
- 33) Nigel P. Minton, Tony Atkinson, Chris J. Bruton, Roger F. Sherwood / The complete nucleotide sequence of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2 / *Gene*, 31, 1-3, 31-38 (1984)
- 34) E P Wehner, E Rao, M Brendel / Molecular structure and genetic regulation of SFA, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product / *Molecular and Cellular Biology*, 237, 3, 351-358 (1993)
- 35) H Shuttleworth, J Taylor, N Minton / Sequence of the gene for alkaline phosphatase from *Escherichia coli* JM83 / *Nucleic Acids Research*, 14, 21 (1986)
- 36) Beernink P. T, Endrizzi J. A, Alber T, Scachman H. K / Assessment of the allosteric mechanism of aspartate transcarbamoylase based on the crystalline structure of the unregulated catalytic subunit / *Proceedings of the national academy of sciences*, 96, 10, 5388-5393 (1999)
- 37) Hyomi Park, Joong Sup Shim, Beom Seok Kim, Hye Jin Jung, Tae-Lin Huh, Ho Jeong Kwon / Purpurin inhibits adipocyte derived leucine aminopeptidase and angiogenesis in a zebrafish model / *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450, 1, 561-567 (2014)
- 38) Markus Kroemer, Georg E Schulz / The structure of L-rhamnulose 1-phosphate aldolase (class II) solved by low resolution SIR phasing and 20-fold NCS averaging / *Acta Crystallographica Section D, Biological crystallography*, 58, 5, 824-832 (2002)
- 39) A Nordwig, H Mayer / The cleavage of prolyl

- peptided by kidney peptidases. Detection of a new peptidase capable of removing *N*-terminal proline / Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische chemie, 354, 4, 380-383 (1973)
- 40) J T Pronk, H Yde Steensma, J P Van Dijken / Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* / Microbiology Journal Yeast, 12, 16, 1607-1633 (1996)
- 41) Andrea Spallarossa, Fabio Forlani, Aristodemo Carpen, Andrea Armirotti, Silvia Pagani, Martino Bolognesi, Domenico Bordo / The "rhodanese" fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: crystal structure of SseA from *Escherichia coli* / Journal of Molecular Biology, 335, 2, 583-593 (2004)
- 42) Xiang Liu, Sabine Bastian, Christopher D Snow, Eric M Brustad, Tatyana E Saleski, Jian He Xu, Peter Meinhold, Frances H Arnold / Structure guided engineering of *Lactococcus lactis* alcohol dehydrogenase LIAdhA for improved conversion of isobutyraldehyde to isobutanol / Journal of Biotechnology, 164, 2, 188-195 (2012)
- 43) Bryce V Plapp, Baskar Raj Savarimuthu, Daniel J Ferraro, Jon K Rubach, Eric N Brown, S Ramaswamy / Horse Liver Alcohol Dehydrogenase: Zinc Coordination and Catalysis / Biochemistry, 56, 28, 3632-3646 (2017)
- 44) Linda J W Shimon, Edi Goihberg, Moshe Peretz, Yigal Burstein, Felix Frolow / Structure of alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica* / Acta Crystallographica Section D, 62, 5, 541-547 (2006)
- 45) C P Macol, H Tsuruta, B Stec, E R Kantrowitz / Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase / Nature Structural & Molecular Biology, 8, 5, 423-426 (2001)
- 46) Dirk De Vos, Ying Xu, Tony Aerts, Filip Van Petegem, Jozef J Van Beeumen / Crystal structure of *Sulfolobus acidocaldarius* aspartate carbamoyltransferase in complex with its allosteric activator CTP / Biochemical and Biophysical Research Communications, 372, 1, 40-44 (2008)
- 47) Hidong Kim, William N. Lipscomb / Crystal structure of the complex of carboxypeptidase A with a strongly bound phosphonate in a new crystalline form: comparison with structures of other complexes / Biochemistry, 29, 23, 5546-5555 (1990)
- 48) Mark E. Bunnage, Julian Blagg, John Steele, Dafydd R. Owen, Charlotte Allerton, Andrew B. McElroy, Duncan Miller, Tracy Ringer, Ken Butcher, Kevin Beaumont, Karen Evans, Andrew J. Gray, Stephen J. Holland, Neil Feeder, Robert S. Moore, David G. Brown / Discovery of Potent & Selective Inhibitors of Activatable Fibrinolysis Inhibitor for the Treatment of Thrombosis / Journal of Medicinal Chemistry, 50, 24, 6095-6103 (2007)
- 49) Djalal Meziane Cherif, Peter J Stogios, Elena Evdokimova, Alexei Savchenko, Patrice Courvalin / Structural basis for the evolution of vancomycin resistance D, D-peptidases / Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 111, 16, 5872-5877 (2014)
- 50) Ki Hyun Nam / Structural analysis of metal chelation of the metalloproteinase thermolysin by 1, 10-phenanthroline / Journal of Inorganic Biochemistry, 215 (2021)
- 51) S A Lister, D R Wetmore, R S Roche, P W Codding / E144S active site mutant of the *Bacillus cereus* thermolysin like neutral protease at 2.8 Å resolution / Acta Crystallographica Section D, 52, 3, 543-550 (1996)
- 52) A Carfi, E Duee, R Paul Soto, M Galleni, J M Frere, O Dideberg / X-ray structure of the Zn II beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* in an orthorhombic crystal form / Acta Crystallographica Section D, Biological crystallography, 54, 1, 45-57 (1998)
- 53) L Ma, E R Kantrowitz / Kinetic and X-ray structural studies of a mutant *Escherichia coli* alkaline phosphatase (His-412 → Gln) at one of the zinc binding sites / Biochemistry, 35, 7, 2394-2402 (1996)
- 54) E Hough, L K Hansen, B Birknes, K Jynge, S Hansen, A Hordvik, C Little, E Dodson, Z Derewenda / High resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus* / Nature, 338, 6213, 357-360 (1989)
- 55) S Chakravarty, K K Kannan / Drug protein interactions. Refined structures of three sulfonamide drug complexes of human carbonic anhydrase I enzyme / Journal of Molecular Biology, 243, 2, 298-309 (1994)
- 56) Satish K. Nair, David W. Christianson / Structural consequences of hydrophilic amino acid substitutions in the hydrophobic pocket of human carbonic anhydrase II / Biochemistry, 32, 17, 4506-4514 (1993)