

九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：2009083F

B L 番号：15

(様式第 5 号)

急速凍結 XAFS 分光法による低温適応無機ピロホスファターゼの 金属活性中心の局所構造解析

Structural analysis of the metal active center of cold-adapted inorganic
pyrophosphatase by rapid-freeze XAFS spectroscopy

丸岡早紀、堀谷正樹、渡邊啓一

Saki Maruoka, Masaki Horitani, and Keiichi Watanabe

佐賀大学

Saga University

- ※ 1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※ 2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開〔論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表〕が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※ 3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より 1 人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

低温適応無機ピロホスファターゼ（Sh-PPase）の基質類似物 PNP との複合体の凍結溶液の Zn K 端 EXAFS 測定を行った。Sh-PPase の持つ温度依存性による構造の変化が EXAFS 測定・解析によって検出できるのかを調べるため、0℃と 40℃にて調製したサンプルを液体窒素にて急速凍結したサンプルを用いた。従来の測定法の問題点を解決するため、磁石とルミラー板を利用した新たなサンプルホルダーを導入し、温度が異なる酵素の測定に成功した。Zn 酵素の PNP 複合体での測定では、高 SN 比の EXAFS スペクトルを得ることができ、温度変化による金属活性中心の構造変化を捉えた。今後の課題として、高波数側の EXAFS 振動のノイズを低減し、Sh-PPase の活性中心の金属置換メカニズムや活性の強さ、温度依存性について解明する。

（English）

We conducted Zn K-edge X-ray absorption fine structure (EXAFS) measurements on frozen solutions of the cold-adapted inorganic pyrophosphatase (Sh-PPase) with substrate analog PNP. We aimed to investigate temperature-induced structural changes in Sh-PPase using EXAFS analysis. Samples were prepared at 0°C and 40°C and rapidly frozen in liquid nitrogen. To overcome the limitations of conventional methods, we introduced a novel sample holder with magnets and a lumirror plate, enabling successful measurements at different temperatures.

We obtained high signal-to-noise ratio EXAFS spectra for the Zn enzyme PNP complex, catching temperature dependence in the metal active center's structure. Future research will focus on reducing noise in high-frequency EXAFS data and elucidating metal substitution mechanisms, activity strength, and temperature dependence of Sh-PPase. This work aligns with the rigorous standards of scientific literature, aiming to contribute to the understanding of enzyme structural dynamics under varying conditions.

2. 背景と目的

生命を担うタンパク質の約 1/3 は金属を含み、これらの金属は目的に応じた錯体を形成し、タン

パク質構造の維持・安定化、触媒機能や電子伝達など、生命活動に不可欠な機能を発揮している。本研究で対象とする無機ピロホスファターゼは、無機ピロリン酸をリン酸へ加水分解する酵素で、細胞内のエネルギー代謝に関わり、生命活動に必須な金属酵素である。申請者らは、南極海好冷細菌 *Shewanella* sp. AS-11 由来の無機ピロホスファターゼ(Sh-PPase)を大腸菌で発現・精製し金属要求性を調べた結果、遷移金属の Mn、Co、Zn により著しく活性化されることを見出した。¹⁻³⁾ 興味深いことに、これらの酵素の触媒活性の強さや温度依存性は著しく異なり、至適温度は 5℃ (Mn)、30℃ (Co)、20℃ (Zn)であった。また、酵素自身の熱安定性については、未活性化酵素と比較して Mn および Co-Sh-PPase は低く、逆に Zn-Sh-PPase は高かった。この様に活性中心金属の変換のみで酵素活性の温度特性が大きく変化する現象は、金属とタンパク質の相互作用によって生み出される機能発現の分子メカニズムを解き明かす上で重要である。

これまで申請者らは、Sh-PPase の活性部位の金属種の変換により、活性の強さと温度依存性や熱安定性が変化する機構を分子・原子レベルで解き明かすことを目的として結晶構造解析を進め、最近、Mn-Sh-PPase の結晶構造を 2.2 Å、Mg-Sh-PPase 基質類似物複合体の結晶構造を 1.3 Å の分解能で明らかにした。⁴⁾ Sh-PPase の活性部位は 2 つの Mn²⁺ からなる複核中心をもつ (図 1)。2 つの Mn イオンは加水分解反応に必要な OH⁻ イオンがブリッジしている。溶液中での Mn-Sh-PPase の EPR 解析と合わせて、本酵素の低温活性には基質非結合型でのゆるい OPEN 型構造が重要で、低温環境下においても基質が結合すると CLOSE 型の酵素反応に適した活性部位構造へ変化することを示唆した。⁴⁾ PPase の酵素反応においては、この構造変化の速度が重要になる。

以上の結果を踏まえて、本課題では、Sh-PPase がどのようなメカニズムで遷移金属種を置換することで、異なる活性の強さや温度依存性を示すようになるのかを解明するために、Mn、Co、Zn で活性化した酵素について、異なる温度で基質と混合し、瞬間凍結により反応を止め、XAFS 分光法により、基質結合後に起こる金属活性中心の局所構造変化の温度依存性を原子レベルの分解能で解析することを目的とする。



図 1. Sh-PPase の活性中心
M1 と M2 に Mn、M3 と M4 に Mg が配位

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

前回の実験では凍結試料のハンドリング、マウント、EXAFS測定および解析方法を検討した。

Sh-PPaseの大腸菌での発現、精製とZnで活性化した酵素の調製は既報の方法³⁾に従い行った。酵素と基質類似物との複合体は、同濃度の酵素と5 mM イミドニリン酸 (PNP) / 10 mM Mg²⁺ を混合して調製した。酵素溶液 10 μL をPCR用のポリプロピレン製チューブ (容量 0.2 mL) に氷上で加え、液体窒素で凍結保存後、ドライシッパーによりBL15まで搬送した。

凍結酵素溶液のXAFS測定は、BL15にて図2および3に示すように、冷却窒素ガス(100 K以下)気流中に凍結試料チューブをマウントしてX線を照射し、90° 配置にしたシリコンドリフト検出器を用いた蛍光法で行った。活性中心金属K端 (Zn 9.663 keV) のXANESおよびEXAFS領域の蛍光 X線データをステップスキャン法で収集した。波数12 - 16までのスキャン (60分/ループ) を6または7回繰り返して得たデータを平均化した。

XAFS測定データの解析 (データの読み込みからフーリエ変換まで) は、Athena⁵⁾を用い、EXAFSデータへの構造モデルのフィッティングは、Artemis⁵⁾を用いて行った。

4. 実験結果と考察

前回の測定法の問題点として、図 2 (左) に示すように、針金でコイル状に巻いたホルダーに試料チューブを装着し、窒素ガス気流中で測定を行う際にチューブに霜が付着成長し、その重さでチューブの位置がずれてしまうことがあった。そのため、1 ループごとに実験ハッチをあけ、霜を

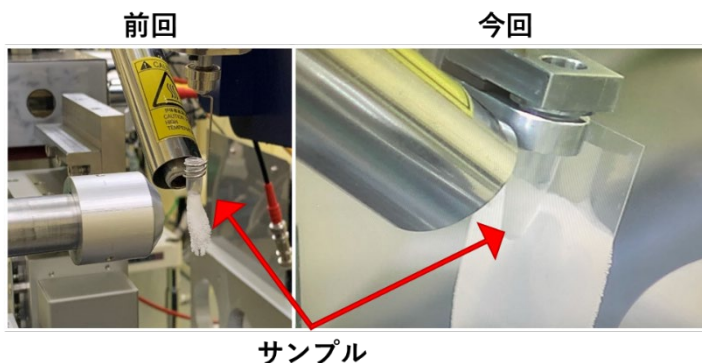


図 2. XAFS測定下におけるサンプルのマウント方法。前回の測定で用いた針金コイルホルダー (左)、今回の測定で用いたマグネティックホルダーとルミラー板 (右)

除去する必要があった。今回は、その対策として、磁石を用いたサンプルホルダーを用い、さらに窒素ガス噴き付け下流であるサンプルチューブの反対側にルミラー板を設置した。高いS/N比を得るために1サンプル当たり、6時間以上の測定が必要であったが、チューブの位置がずれることなく測定に成功した。

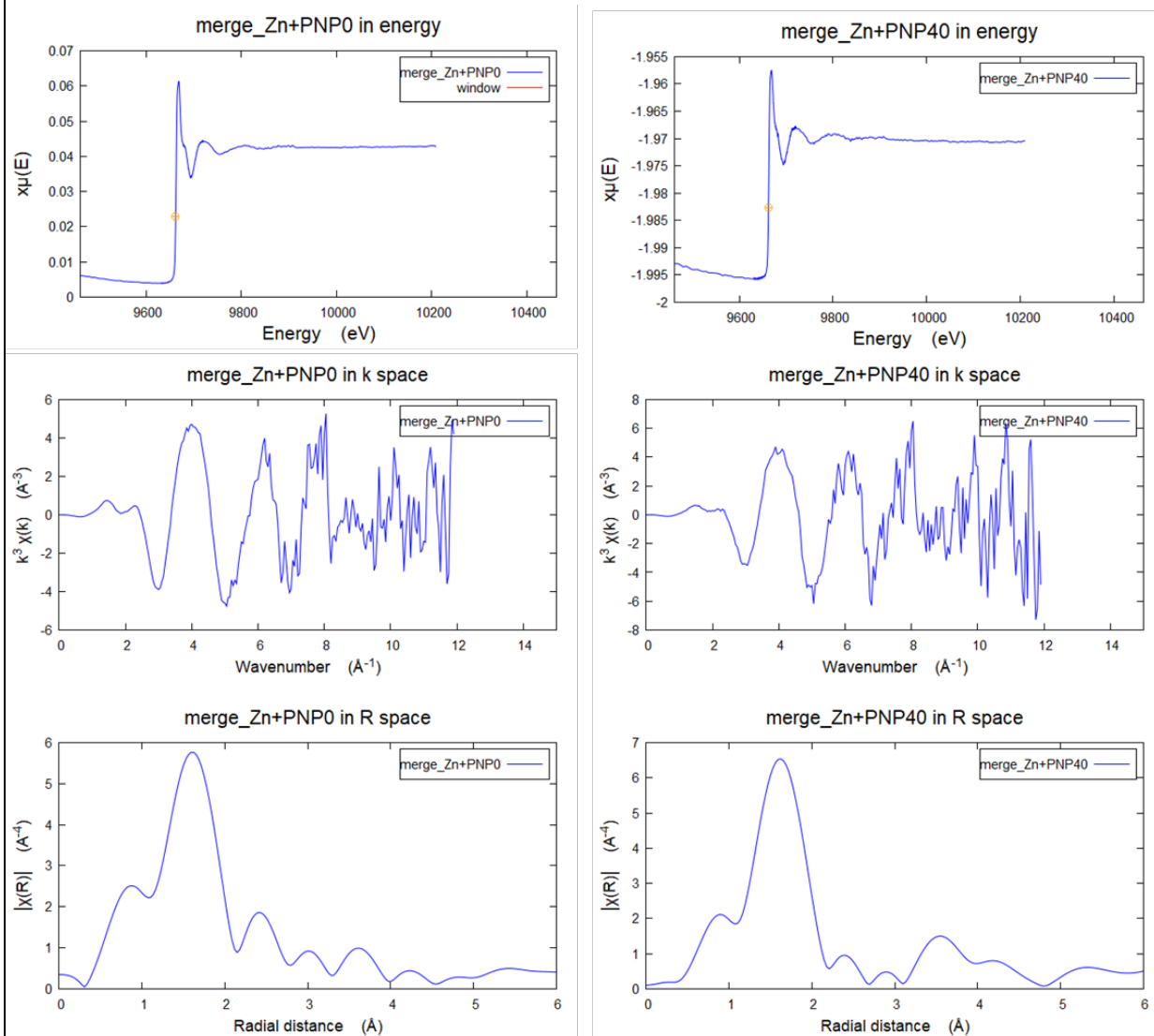


図3. EXAFSデータ。0°CのZn-Sh-PPasePNP複合体サンプルの $\mu(E)$ （左上）、EXAFSスペクトル（真ん中左）、フーリエ変換後（左下）と40°CのZn-Sh-PPasePNP複合体サンプルの $\mu(E)$ （右上）、EXAFSスペクトル（真ん中右）、フーリエ変換後（右下）

Mn-Sh-PPaseでは、EXAFS振動のS/N比が低く、またEXAFS領域が混在するFeの吸収端と重なるために、解析が困難であったため、最もS/N比の高いEXAFSスペクトルを得ることができるZn-Sh-PPaseのPNP複合体で測定を行った。測定エネルギー範囲は9.33～10.64 keVとし、60分間のループスキャンをZn-Sh-PPase 0°Cサンプルでは7回、Zn-Sh-PPase 40°Cサンプルでは6回繰り返し、得られたデータを平均化した。バックグラウンドデータを差し引き、規格化した後に、Plotting k-weightを3としてEXAFS振動を抽出した。また、k-range 3～9にて、フーリエ変換を行ったデータをそれぞれ図3に示す。今回得られたデータのEXAFSスペクトルは、高波数側のノイズはやはり大きいですが、波数(k)～9ほどまでは解析に用いることができるデータを得ることができた。

Zn-Sh-PPase PNP複合体の0°C（青線）と40°C（赤線）サンプルのEXAFSスペクトルを比較すると、第一配位圏である、1～2 Å付近のホワイトラインが0°Cから40°Cに変化すると上昇しており、ピークは、1.61 Åから1.62 Åへ長距離側にシフトしていた。また、第二・第三配位圏であると考えられる2～3 Å付近のホワイトラインは、0°Cから40°Cになると大きく低下しており、ピークは2.41 Åから2.39 Åと短距離側にシフトしていた（図4）。

以上の結果より、温度が異なるZn-Sh-PPaseのPNP複合体の二核中心の局所構造において、得られたフーリエ変換後の動径分布関数に変化が見られた。この変化はSh-PPaseの活性部位のZn周辺の構造が温度によって変化することを示唆しており、温度の変化による微細な構造変化を捉えた

EXAFS 測定に成功したと考えられる。しかし、配位構造の解明や Zn-Zn 間の距離を決定するため SN 比の高い EXAFS スペクトルを得る必要があり、長時間のデータ収集が必須である。そのため、今回のビームタイム時間では二種類のサンプルの測定が限度であったが、次の測定では、0℃と40℃の間の20℃のサン

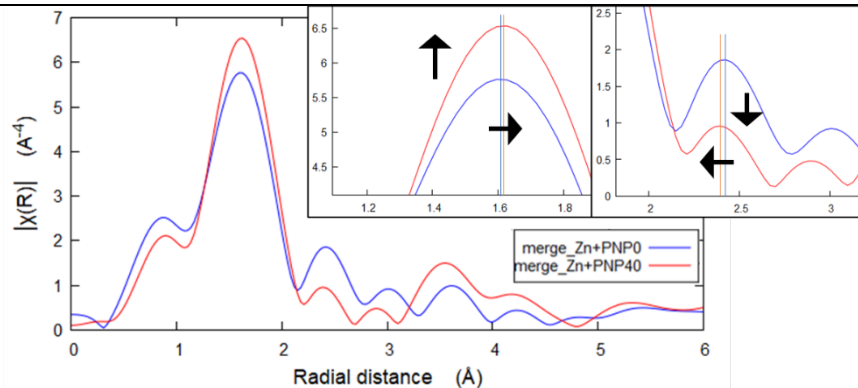


図4. Zn-Sh-PPase PNP複合体のフーリエ変換後スペクトルの重ね合わせ図。0℃のZn-Sh-PPase PNP複合体は青線、40℃のZn-Sh-PPase PNP複合体は赤線で示してある。

プルの測定を行うこと、さらに Zn だけでなく、Co-Sh-PPase サンプルの測定を行う。そして、それらのデータを解析し、原子間距離を比較することで基質結合後に起こる金属活性中心の局所構造変化の温度依存性を原子レベルの分解能で解明できると考えられる。

5. 今後の課題

高波数側の EXAFS 振動のノイズがまだ大きいため、十分なスキャンループ数でスペクトルデータの収集が必要である。どのようなメカニズムで Sh-PPase の活性中心の金属種を置換することで、異なる活性の強さや温度依存性を示すようになるのかを解明するために、低温活性の高い Co-Sh-PPase と、低温活性の低い Zn-Sh-PPase を用いて、異なる温度で基質と混合し、瞬間凍結により反応を止め、EXAFS 測定により、基質結合後に起こる金属活性中心の局所構造変化の温度依存性を原子レベルの分解能で解明する。また、用いている酵素サンプルは二核金属酵素であり、2.5mM の金属溶液と混合してサンプルを調製してある。そのため、XAFS 測定で検出できている EXAFS 振動は、活性部位の二核以外の場所にも金属が結合していないか知る必要がある。よって、金属含有量を蛍光 X 線分析 (XRF) によって求め、測定データの正確性を補強する。

6. 参考文献

1. Ginting E. L., Maeganeku C., Motoshima H., and Watanabe K., Spectroscopic Analyses of Manganese Ions Effects on the Conformational Changes of Inorganic Pyrophosphatase from Psychrophilic *Shewanella* sp. AS-11, Protein J., 33 (2014) 11-17
2. Ginting E.L., Iwasaki S., Maeganeku C., Motoshima H., and Watanabe K., Expression, purification, and characterization of cold-adapted inorganic pyrophosphatase from psychrophilic *Shewanella* sp. AS-11, Prep. Biochem. Biotechnol., 44 (2014) 480-492
3. Ginting E.L., Iwasaki S., Maeganeku C., Motoshima H., and Watanabe K., Functional characteristics of inorganic pyrophosphatase from psychrotroph *Shewanella* sp. AS-11 upon activation by various divalent cations, Asian Journal of Chemistry, 26 (2014) 611-616
4. Horitani M., Kusubayashi K., Oshima K., Yato A., Sugimoto H., and Watanabe K., X-ray crystallography and electron paramagnetic resonance spectroscopy reveal active site rearrangement of cold-adapted inorganic pyrophosphatase, Scientific Reports, 10 (2020) 4368
5. Ravel B. and Newville M., ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, Journal of Synchrotron Radiation, 12 (2005) 537-541

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果) 該当なし

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3) EXAFS、金属活性中心、無機ピロホスファターゼ

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末(2021年3月31日)となります。) 長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期：2022年3月)

