

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：2012136F

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）

2020 年 12 月の実験では、Zn で活性化した低温適応無機ピロホスファターゼ（Sh-PPase）と基質類似物 PNP 複合体について、0℃および 40℃で調製した急速凍結試料の EXAFS 測定を行い、温度依存的な局所構造の変化を捉えることに成功した。しかし、得られたスペクトルの信号対雑音比（SN 比）は十分ではなく、特に Zn-Zn 散乱パスを明確に検出することはできなかった。このことから、より高品質のデータ取得の必要性が明らかになった。

今回（2021 年 2 月）の実験では、前回の課題を改善するために 7 素子シリコンドリフト検出器（SDD）を導入した。その結果、従来の単素子検出器と比較して、少ない繰り返し回数でも同等以上の SN 比を有する EXAFS スペクトルを得ることができた。得られたデータを構造モデルに基づいて解析したところ、Zn 中心は 4 個の O 原子、1 個の N 原子（His）、1 個の O 原子（水分子）、1 個の C 原子（Asp）、さらに Zn 原子の散乱パスを含む六配位モデルで良好に再現された。ただし、Zn-Zn 散乱パスの寄与については依然として精度が不十分であり、二核中心の構造を明確に決定するにはさらなる SN 比の向上が必要であることがわかった。

(English)

In December 2020, rapid-freeze EXAFS measurements of Zn-activated inorganic pyrophosphatase (Sh-PPase) complexed with the substrate analog imidodiphosphate (PNP) were performed on samples prepared at 0 °C and 40 °C. These measurements successfully revealed temperature-dependent structural changes at the Zn active site. However, the signal-to-noise (SN) ratio of the spectra was insufficient, and the Zn-Zn scattering path could not be clearly identified, indicating the need for higher-quality data.

In the present experiment (February 2021), a seven-element silicon drift detector (SDD) was introduced to address this issue. Compared with the conventional single-element detector, the SDD enabled the acquisition of EXAFS spectra with an equal or better SN ratio using fewer repeated scans. Curve-fitting analysis of the spectra demonstrated that the Zn center was consistent with a six-coordinate geometry, including

four O atoms, one N atom (His), one O atom (H₂O), one C atom (Asp), and a Zn scattering path. However, the Zn–Zn contribution could not yet be determined with sufficient accuracy, showing that further improvement in spectral quality will be necessary to fully resolve the dinuclear Zn structure.

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°C (Mn)、30°C (Co)、20°C (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。

2020年12月の急速凍結XAFS測定では、Zn型Sh-PPase-PNP 複合体における温度依存的な局所構造の変化を捉えることに成功したが、SN比不足により配位構造の精密化やZn-Zn散乱パスの検出には至らなかった。そこで今回の実験では、7素子SDDを導入することでSN比を改善し、より詳細な構造解析を進めることを目的とした。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

Sh-PPaseの大腸菌での発現、精製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。酵素濃度は1.2 mM、金属としては2核錯体であるので2.4 mMとした。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、ドライシッパでBL15まで搬送した。

凍結酵素溶液のXAFS測定は、BL15にて冷却窒素ガス(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 (Co 7.710



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

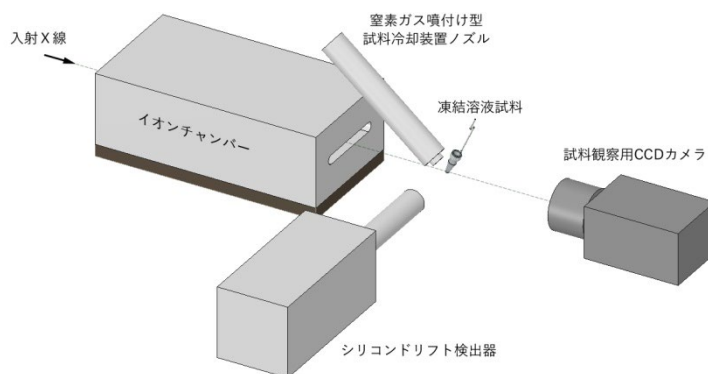


図 2. 凍結金属タンパク質溶液の XAFS 測定レイアウト

keV、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 (40 - 60分/ループ) を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

今回の実験により、Zn-Sh-PPase の 20℃で急速凍結を行ったサンプルの EXAFS データが得られた。これまでに得られていた 0℃と 40℃のサンプルとの重ね合わせ図を図4に示す。0℃から 40℃へと温度が高くなるにつれて XANES のピークが高エネルギー側にシフトしていることが分かった。この結果は、Zn-Sh-PPase の 20℃から 40℃という温度の違いによる Zn 周辺の構造変化を捉えている可能性がある。よって、それぞれの温度帯の Zn-Sh-PPase に対して、フィッティングを行った。代表して、0℃でのフィッティング結果のグラフを図5に示し、さらに、パラメータを表6に示す。理論式に含まれる各変数には、ペナルティが生じないように必要に応じて制限を加えた。

結晶構造⁴⁾では、M1 と M2 何れも、4 個の O、1 個の N (His)、1 個の O (H₂O) がオクタヘドラル構造で配位している。モデル M1 では、これらの 6 個の散乱経路で、図 5A に示すように R=3 Åまで、良好にフィッティングできた。しかし、モデル M2 では、R=2~3 Åのフィッティング結果が悪かったため、理論計算による寄与の大きな C (Asp)を加えたところ、図 5B と表 1 に示すフィッティング結果が得られた。

Mg-Sh-PPase と PNP の複合体の結晶構造と比較して、第一配位圏の 4 配位の Zn-O の距離は近い値であるが、Zn-N(His)と Zn-O(H₂O)の距離は、0.7~1.0 Å長かった。また、今回、EXAFS 振動の SN 比が十分でなかったために、結晶構造で 3.5 Åの距離にある Zn-Zn の散乱パスのフィッティングはできなかった。

これらの結果から、7 素子 SDD の導入によりデータの品質は向上したものの、完全な二核中心構造を決定するにはさらに高い SN 比を有するスペクトルが必要であることが明らかとなった。

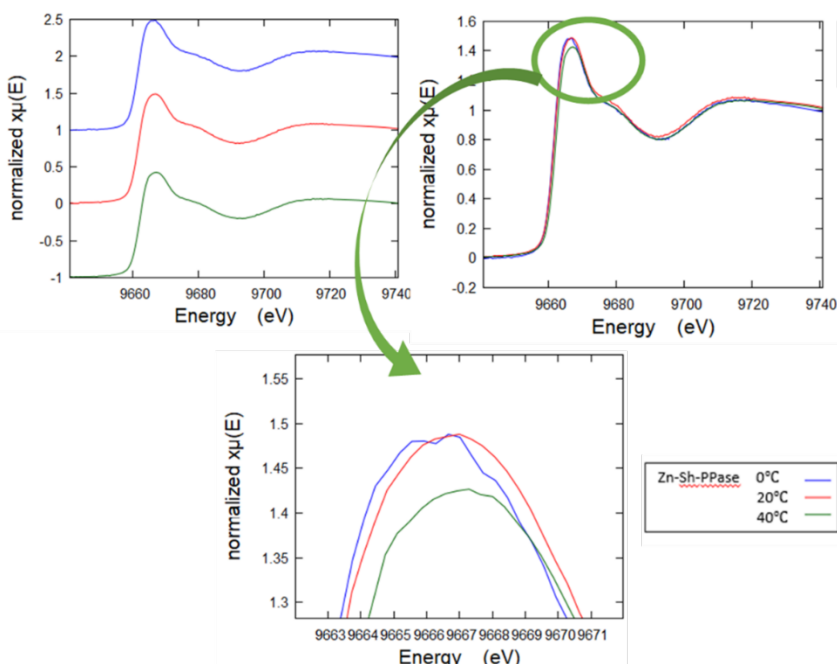


図 3. 0℃~40℃の Zn-Sh-PPase-PNP 複合体の EXAFS データ(μE)のスタッキング図(左上)、重ね合わせ図(右上)とピークの拡大図(下)

5. 今後の課題

今回の実験により、7 素子 SDD の導入によって従来よりも効率的に高品質な EXAFS データを取得できることが確認された。しかし、二核中心の Zn-Zn 散乱を十分な精度で解析するためには、さらなる SN 比改善が必要である。今後は測定ループ数の増加や測定条件の最適化により高波数領域のノイズを低減し、より精密な構造解析を進める予定である。また、次回以降の測定では蛍光 X 線分析を併用して酵素に結合している金属数を定量的に確認し、EXAFS 解析の信頼性を高めたい。さらに、Zn 酵素に加えて Co 酵素についても同様の解析を行い、金属種の違いによる構造変化を比較することで、Sh-PPase の金属依存的触媒機構を包括的に明らかにしていくことを目指す。

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）