

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：2105045F

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¹、堀谷正樹¹、渡邊啓一^{1,2}

Saki Maruoka¹, Masaki Horitani¹, and Keiichi Watanabe^{1,2}

¹ 佐賀大学、² 九州栄養福祉大学

¹Saga University, ²Kyushu Nutrition Welfare 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 月および 2021 年 2 月、5 月の測定において、Zn 型 Sh-PPase-PNP 複合体の温度依存的な EXAFS 解析を進めてきたが、当時の Zn データは信号対雑音比（SN 比）が十分でなく、特に Zn-Zn 散乱パスの検出や精密な構造モデル化に課題を残していた。そこで本課題では、Zn 酵素についてデータを取り直し、より高品質なスペクトルを取得することを目的とした。

今回、0℃、20℃、40℃における Zn 型 Sh-PPase-PNP 複合体を急速凍結し、それぞれ 10～12 回の繰り返し測定を行ってマージ・平均化することで、従来よりも大幅に SN 比が改善されたデータを得ることに成功した。 $k^3 \chi(k)$ スペクトルでは高波数領域における振動が明瞭となり、フーリエ変換スペクトルでも第一配位圏と第二配位圏のピーク形状が鮮明に観測された。特に第一配位圏のピークはよりシャープになり、Zn-O および Zn-N 配位の解析精度が向上した。

さらに得られたデータに基づきフィッティングを行った結果、Zn-O（架橋水）の結合距離は 1.82 Å と算出された。この値は典型的な μ_3 -オキソ架橋の幾何学的特徴と一致しており、本酵素の活性中心に存在する金属架橋水が μ_3 -オキソであることを強く示唆している。これにより、Family II 無機ピロホスファターゼの触媒機構において、架橋水分子がリン酸基への求核攻撃に直接関与するというモデルを支持する新たな証拠を得ることができた。

（English）

In previous experiments conducted in December 2020, February 2021, and May 2021, temperature-dependent EXAFS analyses of Zn-activated Sh-PPase-PNP complexes were attempted. However, the Zn data obtained at that time suffered from insufficient signal-to-noise (SN) ratios, making it difficult to detect Zn-Zn scattering paths or perform reliable structural modeling. Therefore, in the present study, new measurements of Zn samples were undertaken to improve data quality.

Rapid-freeze EXAFS measurements were performed for Zn-Sh-PPase-PNP complexes at 0 °C, 20 °C, and 40 °C. For each condition, 10–12 repeated scans were merged and averaged, resulting in a significant improvement in SN ratio compared to previous

datasets. In the $k^3\chi(k)$ spectra, oscillations in the high- k region became much clearer, while Fourier-transformed spectra exhibited sharper and more distinct peaks in both the first and second coordination shells. In particular, the sharper first-shell peak allowed for more accurate determination of Zn–O and Zn–N coordination.

Curve-fitting analysis of the improved spectra revealed a Zn–O (bridging water) bond distance of 1.82 Å. This distance is consistent with the geometry of a μ_3 -oxo bridge, strongly suggesting that the bridging water at the active site of Zn–Sh-PPase is in fact a μ_3 -oxo species. These findings provide direct structural evidence supporting a catalytic mechanism in Family II inorganic pyrophosphatases, in which the bridging water nucleophile directly attacks the phosphate substrate.

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 酵素は低く、逆に Zn 酵素は高かった。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 Mn^{2+} 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。

これまでの研究で、Zn酵素に関して温度依存的な局所構造の変化を捉えることには成功したものの、スペクトルのSN比不足のために精密な配位構造解析は困難であった。

本課題では、Zn型Sh-PPase-PNP複合体を対象に、繰り返し測定によってSN比を向上させた高品質データを取得し、Zn活性中心に存在する金属架橋水の構造を同定することを目的とした。



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）

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 Mg^{2+} を混合して調製した。酵素溶液 10 μ L 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、ドライシッパーで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 (Mn 6.539 keV、Co 7.710 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10または12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

今回取得した Zn 型 Sh-PPase-PNP 複合体のスペクトル (図3、赤線) は、2020年12月に測定したデータ (図3、青線) と比較して SN 比が大幅に向上していた。 $k^3 \chi(k)$ スペクトルでは、従来不明瞭であった高波数領域の振動が明確となり、Zn-Zn 散乱寄与の検出が可能なレベルに達した。

フーリエ変換スペクトルにおいても、第一配位圏 (～2 Å 付近) のピークがこれまで以上に鋭く観測され、Zn-O および Zn-N 配位の解析精度が大幅に改善した。さらに、第二配位圏 (～3～4 Å 付近) のピークも明瞭となり、二核中心に由来する散乱の寄与を検出できるデータを得られた (図4)。温度によるス

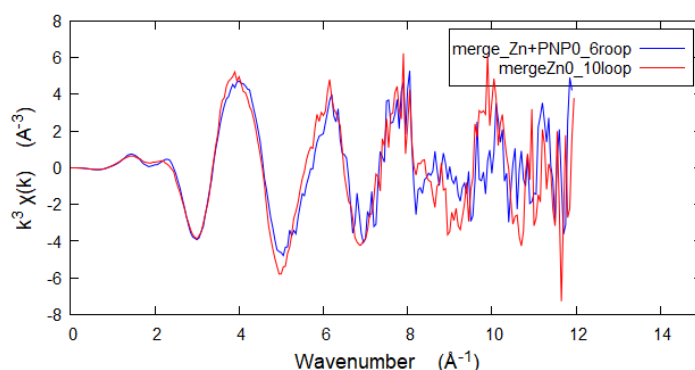


図3. Zn-Sh-PPase-PNP 複合体0°CのEXAFS 振動スペクトル比較

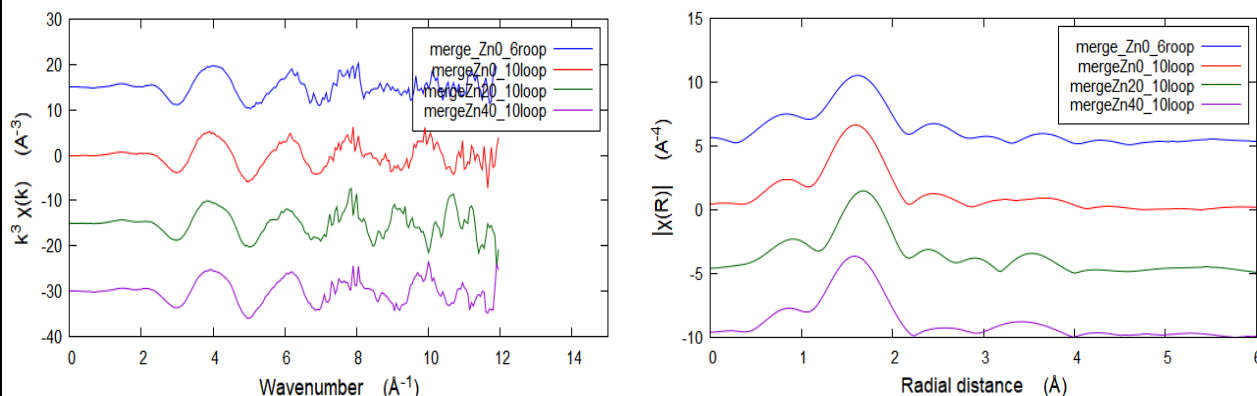


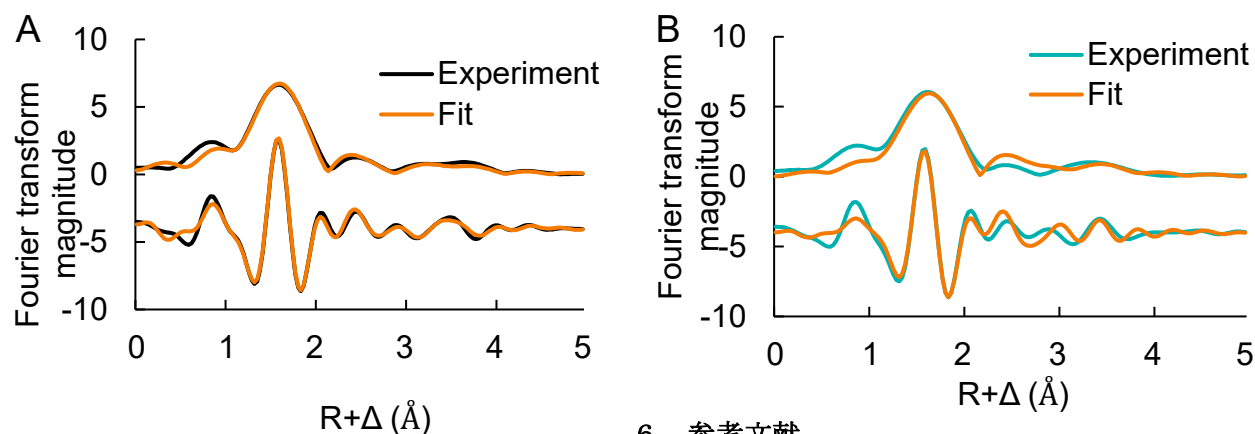
図4. Zn-Sh-PPase-PNP 複合体の EXAFS 振動スペクトルの温度別比較(0～40°C)

ペクトル形状の違いも観察できた。第一配位圏 (～2 Å 付近) のピークにも違いが出ており、特に20°Cでは長距離側にピーク位置がシフトしていた。続く第二配位圏以降でも顕著に温度に依存してスペクトルの形状の違いが確認できたことから、Zn 周辺の局所構造が温度に依存して変化することが示唆された。

これらのスペクトルに基づいてフィッティングを行った (図5)。その結果、特に、Zn-Sh-PPase-PNP 複合体構造において Zn-O (架橋水) の結合距離は 1.82 Å と算出された。この短い距離は典型的な μ_3 -オキソ架橋の幾何学的パラメータと一致しており、Sh-PPase の活性中心に存在する金属架橋水が μ_3 -オキソであることを示唆した。これにより、Family II 無機ピロホスファターゼにおいて、架橋水分子がリン酸基の求核攻撃を担い加水分解反応を駆動するという触媒機構モデルが支持された (表1)。

5. 今後の課題

今回の Zn 酵素データにより、 μ_3 -オキソ架橋水の存在を示唆する重要な知見を得た。今後は Co 酵素で得られた温度依存データとの比較を進め、金属種による局所構造と触媒機構の違いを体系的に理解することが課題となる。また、さらに精密なフィッティングおよび理論計算との統合解析により、 μ_3 -オキソ水分子の反応経路における役割を定量的に明らかにする予定である。



6. 参考文献

表1. Zn-Sh-PPase の基質なしおよび PNP 複合体のフィッティング結果 (0°C)

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）