

# 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：2112143F

BL番号：15

(様式第5号)

溶液および急速凍結 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 XAFS spectroscopy in solution and in a rapidly frozen state

丸岡早紀<sup>1</sup>、堀谷正樹<sup>1</sup>、渡邊啓一<sup>1,2</sup>

Saki Maruoka<sup>1</sup>, Masaki Horitani<sup>1</sup>, and Keiichi Watanabe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>佐賀大学、<sup>2</sup>九州栄養福祉大学

<sup>1</sup>Saga University, <sup>2</sup>Kyushu 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）

本課題では、南極海好冷細菌由来の無機ピロホスファターゼ（Sh-PPase）の金属活性中心における生成物リン酸（Pi）の結合様式とその温度依存性を明らかにすることを目的として、BL15にて溶液および急速凍結試料の XAFS 測定を行った。Zn-ShPPase および Co-ShPPase に Pi を 0～50 mM の濃度で添加し、5℃、20℃、40℃で測定した。XANES の結果、Zn-ShPPase では 5℃および 20℃で Pi 濃度の増加に伴いホワイトライン強度が減少したが、40℃では顕著な変化は認められなかった。一方、Co-ShPPase ではホワイトライン強度の減少は見られなかったが、Pi 濃度増加に伴いピーク位置のシフトが確認された。EXAFS 解析では、Zn-ShPPase において Pi 添加により第一配位圏ピークが短距離側にシフトし、フリー酵素が五配位モデルで良好に再現されたのに対し、Pi 存在下では六配位モデルの適合性が高かった。以上の結果から、Pi の結合は Zn および Co 酵素で異なる構造変化を引き起こし、金属周辺の局所構造や Pi との結合様式が変化することが示唆された。

## (English)

In this study, XAFS measurements were performed at BL15 using both solution and rapid-frozen samples of the psychrophilic inorganic pyrophosphatase (Sh-PPase) to elucidate the binding mode of the reaction product inorganic phosphate (Pi) at the metal active site and its temperature dependence. Zn- and Co-ShPPase samples were prepared with Pi concentrations ranging from 0 to 50 mM and measured at 5, 20, and 40 °C. In Zn-ShPPase, XANES showed a decrease in white-line intensity with increasing Pi concentration at 5 and 20 °C, whereas no significant changes were observed at 40 °C. In Co-ShPPase, no decrease in white-line intensity was observed, but the peak position shifted with increasing Pi concentration. EXAFS analysis revealed that in Zn-ShPPase, Pi addition caused the first-shell peak to shift to shorter distances. The Pi-free enzyme was well reproduced by a five-coordinate model, while the Pi-bound state was better described by a six-coordinate model. Taken together, these results indicate that Pi binding induces distinct structural changes in Zn- and Co-bound enzymes, leading to

alterations in the local structure around the metal center as well as in the binding mode of Pi.

## 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。<sup>1-3)</sup> 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。<sup>4)</sup> 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。<sup>4)</sup> 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。本研究グループの速度論的解析により、この酵素の触媒反応における律速段階は加水分解そのものではなく、生成物である Pi の解離である可能性が示唆された。

本実験では、XAFS 測定を用いて Zn および Co 活性中心と Pi の相互作用を直接的に観察し、その温度依存性を明らかにすることを目的とした。特に溶液状態での測定を導入することで、より生理的条件に近い環境での配位構造解析を試みた。

## 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、精製と Mn、Zn、Co で活性化した酵素の調製は既報の方法<sup>3)</sup> 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。Pi を 0-50 mM の範囲で添加したサンプルを調製し、5°C、20°C、40°C で測定した。酵素溶液 10  $\mu$ 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。



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

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、冷却窒素ガス気流中に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2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、Athena<sup>5</sup>を用い、EXAFSデータへの構造モデルのフィッティングは、Artemis<sup>5</sup>を用いて行った。

#### 4. 実験結果と考察

本実験では、以前のような凍結サンプルではなく、凍結されていない溶液サンプルを各温度（5、20、40℃）での測定に成功した。

XANES 測定の結果、Zn-ShPPase+Pi 試料では 5℃および 20℃において Pi 濃度の増加に伴いホワイトライン強度が減少した（図3）。これに対し 40℃では Pi 濃度を変化させても顕著な変化は認められなかった。一方、Co-ShPPase+Pi 試料では、Zn-ShPPase+Pi のようなホワイトライン強度の低下が見られなかったが、濃度が増加すると、ピーク位置がシフトしていることがわかった（図4）。このことから、Zn と Co では Pi に対する構造変化が異なることが示唆された。

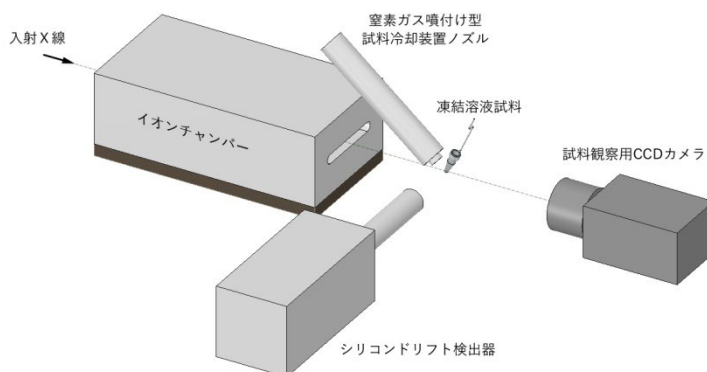


図 2. 金属タンパク質溶液の XAFS 測定レイアウト

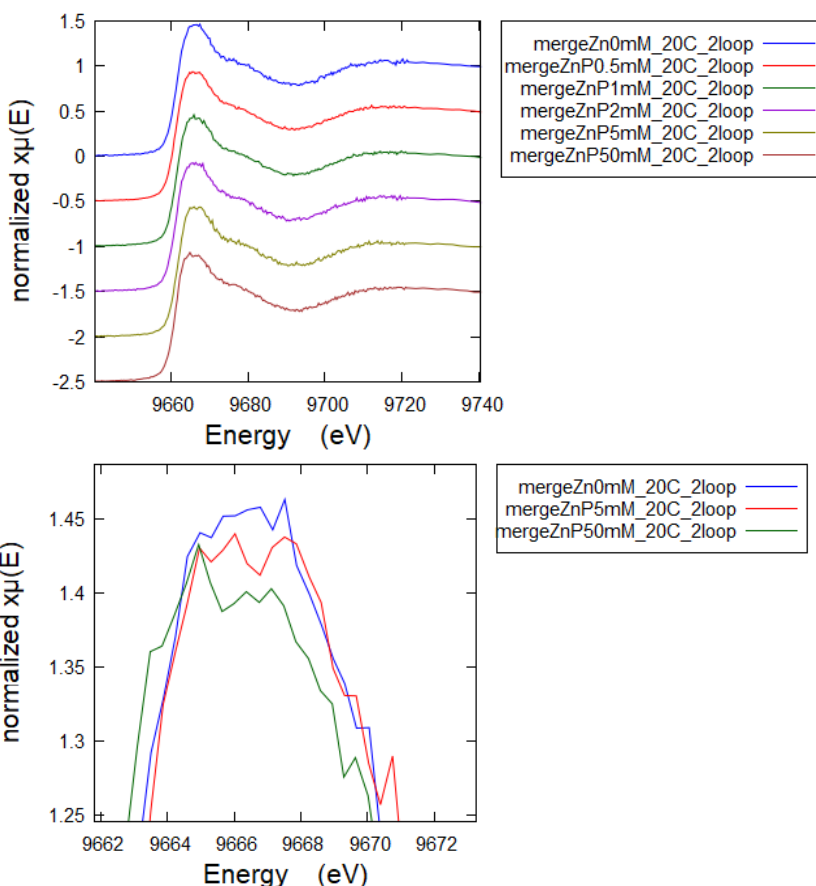


図 3. Zn-Sh-PPase の XANES スペクトル(上:全体、下:拡大図)

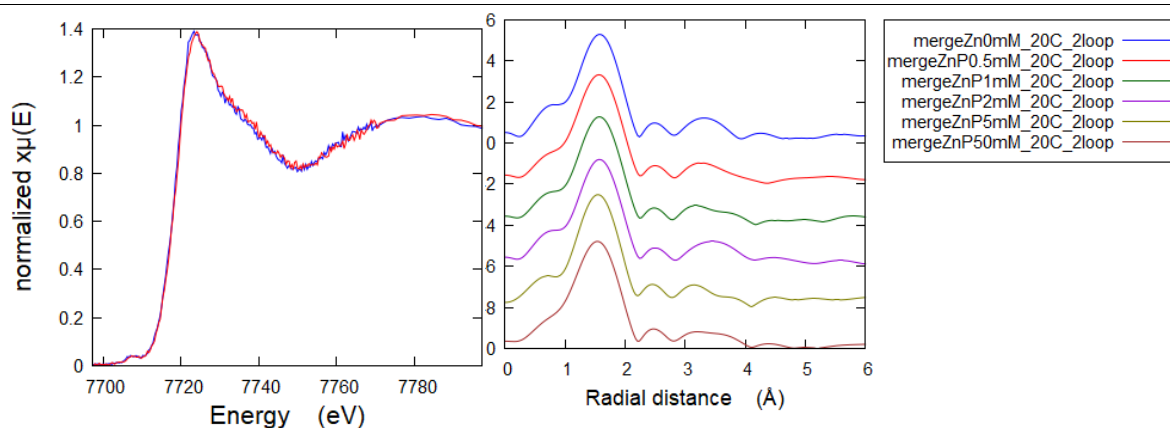


図 4. Co-Sh-PPase の XANES スペクトル(左:全体、右:拡大図)

EXAFS 測定では、Pi 添加により第一配位圏ピークが短距離側にシフトした。Zn-ShPPase フリー試料は 5 配位モデルで良好に再現されたのに対し、Pi 添加試料では PNP 複合体試料と同様に、6 配位モデルの適合性が高かった。

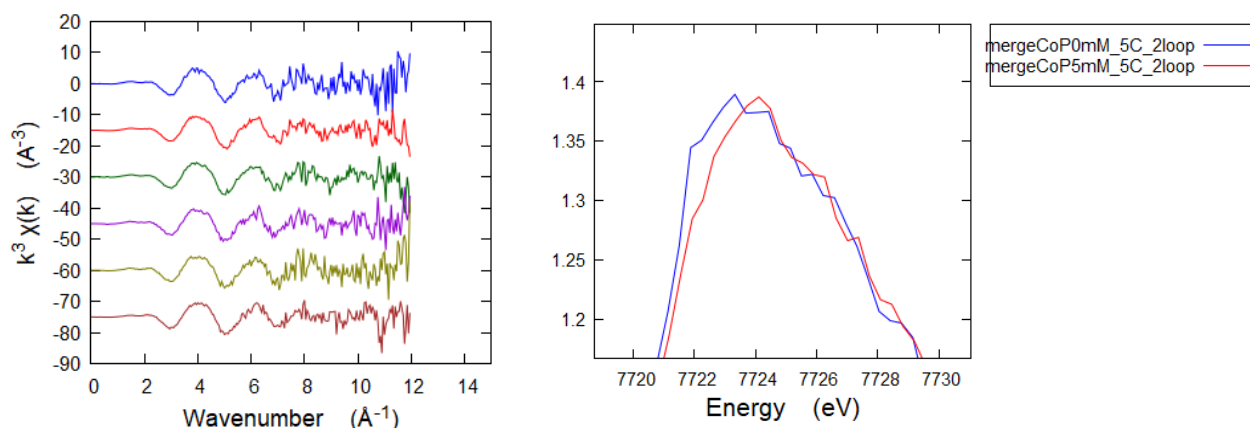


図 4. Zn-Sh-PPase の EXAFS スペクトル(左) とフーリエ変換後スペクトル(右)

## 5. 今後の課題

今回の測定は主として Zn 酵素について実施した。今後は Co 酵素についても同様の条件で解析を行い、金属種による生成物結合様式の違いを明らかにする必要がある。また、今回の実験では 2 回測定し積算したデータであったことから、測定時間不足によりノイズが大きかったため、積算回数を増加させ SN 比をさらに改善する必要がある。

## 6. 参考文献

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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）**