

(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 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）

活性中心に 2 個の Zn(II) を有する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。フーリエ変換 EXAFS データに対して、X 線結晶構造を基に作成した理論散乱パスのフィッティングを行った結果、6 配位の Zn 構造が比較的良くフィットできることが分った。しかし、Zn-N(His) と Zn-O(water) および Zn-Zn の距離を特定するためには、さらに、SN 比の高い EXAFS 振動を得る必要があった。

#### (English)

Zn K-edge EXAFS measurement of a frozen solution of a complex with a substrate analog PNP of low temperature-adapted inorganic pyrophosphatase (Sh-PPase) having two Zn(II)s in the active center was performed. As a result of fitting the theoretical scattering paths created based on the X-ray crystal structure to Fourier-transformed EXAFS data, it was found that a structure of 6-coordinated Zn can be relatively well fitted. However, in order to specify the distances between Zn-N (His), Zn-O (water) and Zn-Zn, it was necessary to further obtain EXAFS oscillation with a high SN ratio.

#### 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<sup>2+</sup>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<sup>-</sup>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。

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)

最近、金属タンパク質の急速凍結試料のEXAFS測定の結果は国内ではないために、本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。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<sup>2+</sup>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2または3回繰り返して得たデータを平均化した。

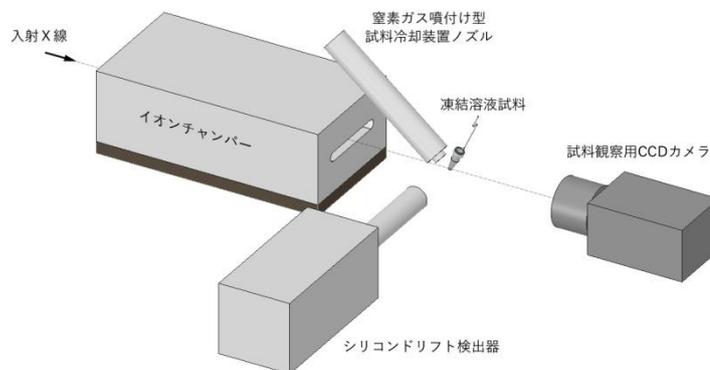


図2. 凍結金属タンパク質溶液のXAFS測定レイアウト

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

3回までのループスキャンでEXAFSスペクトルに変化がないことから、測定中の酵素のX線損傷の影響は無視できることを確認した。本測定法の問題点として、図3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、霜を除去する必要があった。



図3. XAFS測定後の試料チューブ

Mn 酵素では、EXAFS 振動の SN 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。最も SN 比の高い EXAFS スペクトルは、Zn 酵素の PNP 複合体で得られた。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 3 回繰り返して、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 振動を抽出した結果を図 4 に示す。k-range を EXAFS 振動が観察される 3~10 としてフーリエ変換を行った結果、図 5 に青線で示す動径構造関数が得られた。

Zn K 端 EXAFS の理論計算を行うための構造モデルは、Mg-Sh-PPase と PNP の複合体の結晶構造 (PDB ID: 6LL8) を基に作成した。活性中心金属 M1 と M2 (図 1) を Mg から Zn に置き換え、M1 または M2 の周辺 4.0 Å 以内の距離に位置する原子座標を、空間群、格子定数と共に Atoms に入力し、クラスターサイズと最長パスは、それぞれ 5.0 Å とした。得られた入力ファイルを用いて、プログラム FEFF を実行し散乱パスを理論計算した。次に EXAFS 振動の k-range 3~10 でフーリエ変換して得られた動径構造関数に対して、R-range 1~4 として、M1 と M2 周辺の構造モデルのフィッティングを行った (図 5、表 1)。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<sup>4)</sup>では、M1 と M2 何れも、4 個の O、1 個の N (His)、1 個の O (H<sub>2</sub>O) 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ので、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(H<sub>2</sub>O)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。

表 1. Zn-Sh-PPase の PNP 複合体の動径構造関数に対するフィッティング結果

model	Distance in Å (atom number)				Reduced $\chi^2$	R-factor
	Zn-O	Zn-O (water)	Zn-N (His)	Zn-C (Asp)		
M1	2.04 (4)	3.03 (1)	2.98 (1)		26	0.026
M2	2.04 (4)	2.72 (1)	3.07 (1)	2.54 (1)	32	0.025

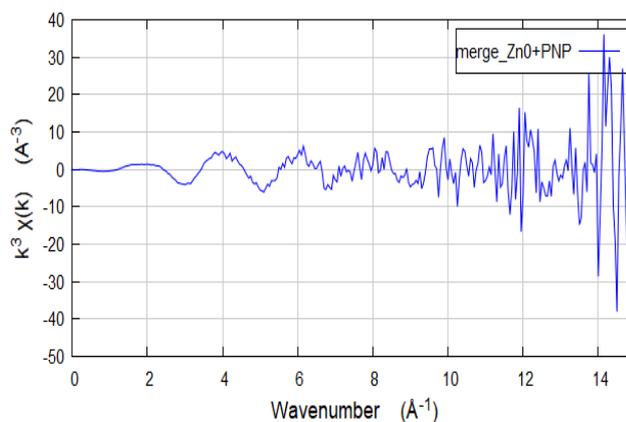


図 4. Zn-Sh-PPase の PNP 複合体の Zn K 端 EXAFS 振動

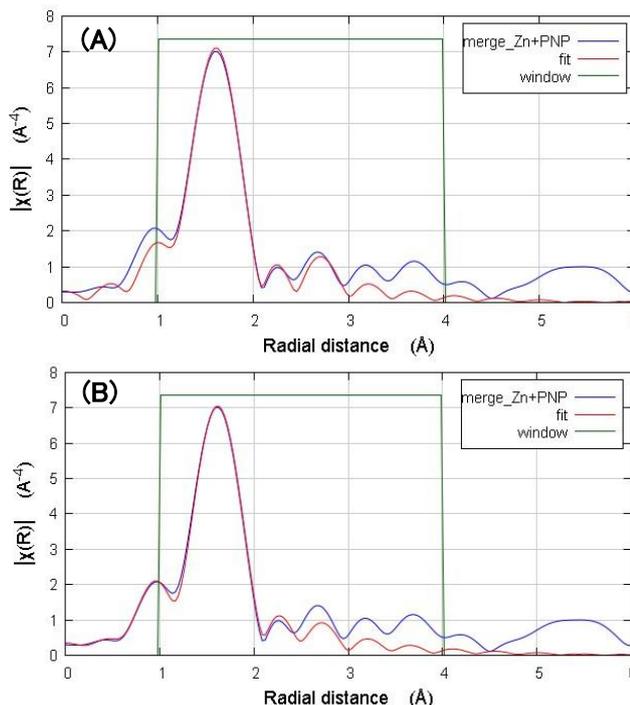


図 5. 図 4 の動径構造関数

青線: 実験データ  
赤線: M1(A)および M2(B)周辺構造モデルのフィッティング結果

以上の結果より、Zn-Sh-PPase の PNP 複合体の二核中心の局所構造の EXAFS 解析が可能であることが分った。しかし、配位構造の解明や Zn-Zn 間の距離を決定するためには、さらに SN 比の高い EXAFS スペクトルを得る必要があった。そのために、酵素濃度を本実験以上に高めることはできないので、①スキャンループ数を増やす、②X 線輝度を高める、③検出感度を高めるなどの対策が考えられる。

## 5. 今後の課題

EXAFS 測定法としては、窒素ガス気流により試料チューブに付着する霜を防ぐ工夫と試料チューブが測定中に動かないホルダーの開発が必要である。SN 比の高い EXAFS 振動を得るために、入射 X 線の輝度と検出感度を高め、十分なスキャンループ数でスペクトルデータの収集を行う。

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 酵素と、低温活性の低い Zn 酵素を用いて、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。

## 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)