

# 急速凍結 XAFS 法による低温適応 無機ピロホスファターゼの温度特性機構の解明

○丸岡早紀<sup>1</sup>, 馬込 栄輔<sup>2</sup>, 瀬戸山 寛之<sup>2</sup>, 河本 正秀<sup>2</sup>, 堀谷正樹<sup>1</sup>, 渡邊啓一<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>佐賀大先進,<sup>2</sup>SAGA-LS,<sup>3</sup>九州栄養福祉大  
 21626023@edu.cc.saga-u.ac.jp

## 1. 緒言

タンパク質の約 1/3 は何らかの形で金属を含んでいる。金属酵素の特異な機能は、活性中心である金属イオン周辺の配位構造とそれを取り巻く環境、電子状態に依存している。本研究では南極海氷下に生息する細菌 *Shewanella* sp.AS-11 由来の低温適応無機ピロホスファターゼ(Sh-PPase)を研究対象とした。Sh-PPase は、1 分子の無機ピロリン酸を 2 分子の無機リン酸に加水分解する酵素であり、生合成反応完結に関わることから、すべての生物に必須な酵素である。また、分子量 34 kDa で金属結合型はホモ二量体を形成し、活性中心に二価遷移金属イオンを 2 つ持つ。これまでの先行研究で、Sh-PPase は活性中心に配位する二価金属イオンの種類によって、酵素活性の温度依存性や熱安定性といった温度特性が異なることが明らかとなっている(図 1)[1,2]。また、

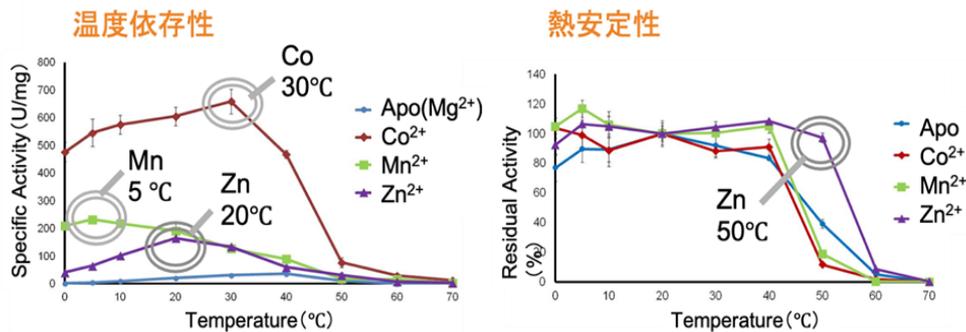


図 1. Sh-PPase の温度依存性と熱安定性

Mn-Sh-PPase の結晶構造を 2.2 Å、Mg-Sh-PPase と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ている(図 2)[3]。したがって、本研究では 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、X 線吸収分光法(XAFS)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した。

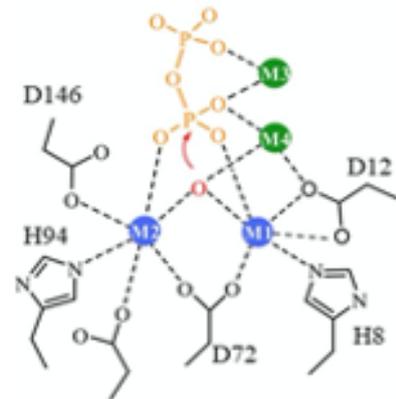


図 2. Sh-PPase の活性中心  
M1 と M2 に Mn、M3 と M4 に Mg が配位

## 2. 実験

Sh-PPase は組換え大腸菌で過剰発現させ、硫酸分画、陰イオンクロマトグラフィー、限外濾過を行い精製した。Mn、Co、Zn で活性化した酵素について、基質類似物イミド二リン酸(PNP)と混合し、それぞれの温度(0、20、40°C)でインキュベート後に液体窒素急速凍結法により反応を止め保存した。また、70~90°Cで 10 分間インキュベーター

ト後に液体窒素で凍結し、完全変性サンプルを得た。九州シンクロトロン光研究センター(SAGA-LS)BL15で蛍光測定システムを組み、冷却窒素ガス(100 K 以下)気流中で凍結試料を含むポリプロピレン製チューブをマウントし、活性中心金属 K 端の XAFS 測定を行った。XAFS 測定データの読み込みからフーリエ変換までは Athena を、EXAFS データへの構造モデルのフィッティングは Artemis を用いた。理論散乱パスは、Mg-Sh-PPase と PNP の複合体の結晶構造(PDB ID: 6LL8)を基に作成した。

### 3. 結果と考察

それぞれの金属で活性化した酵素と PNP の複合体を測定した結果、Zn-Sh-PPase と Co-Sh-PPase の XAFS データを得ることができた。Mn-Sh-PPase では、EXAFS 振動の SN 比が低く、EXAFS の振動抽出、解析が困難であった。Co と Zn 活性型酵素の何れにおいても、0、20、40°C で急速凍結した試料の EXAFS 振動をフーリエ変換して得られた動径分布関数に明らかな違いが認められ、Co と Zn 酵素間でも違いが認められた(図 3)。現在、動径分布関数への理論散乱パスのカーブフィッティングを行い、活性中心金属周辺の局所構造解析を行っている。

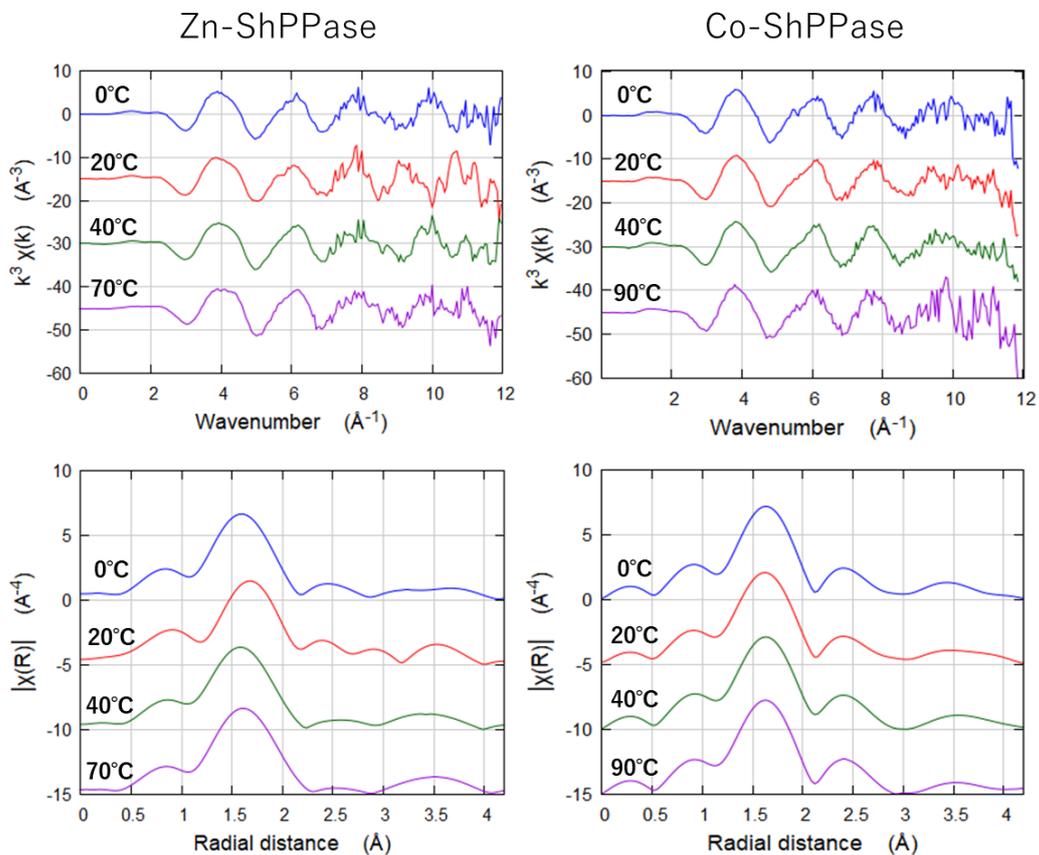


図 3. Zn-ShPPase/PNP(左)、Co-Sh-PPase/PNP(右)の K 端 EXAFS 振動(上)と動径分布関数(下、波数 3-9 Å<sup>-1</sup> でフーリエ変換)

### 4. 参考文献

- [1] Ginting E.L., Iwasaki S., Maeganeku C., Motoshima H., Watanabe K., *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **2014**, 44, 480.
- [2] Ginting E.L., Iwasaki S., Maeganeku C., Motoshima H., Watanabe K., *Asian J. Chem.*, **2014**, 26, 611.
- [3] Horitani M., Kusubayashi K., Oshima K., Yato A., Sugimoto H. Watanabe K., *Sci. Rep.*, **2020**, Sci. Rep. 10, 4368.