



かご型錯体に内包された金属酵素結晶の XAFS 解析

中間 貴寛 佐藤 宗太

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

キーワード：XAFS, かご型金属錯体, 金属酵素, 結晶

1. 測定実施日

2024年5月31日 BL5S1 (1シフト)

2024年6月25日 BL11S2 (2シフト)

2025年2月12日13日 BL11S2 (3シフト)

2. 概要

タンパク質の結晶化は、その産業応用、構造解析のいずれの目的でも簡便で汎用的な手法が望まれている。当研究室では、かご型の巨大な中空金属錯体(内径 4-6 nm)にタンパク質 1 分子の内包を達成し、その孤立一義空間を活用したタンパク質の安定化・構造解析を実現してきた¹⁻³。本研究では、かご型錯体への包接をタンパク質の結晶化・固定化法へと展開し、単結晶中の金属酵素の構造を X 線吸収微細構造解析(XAFS)で評価した。錯体へ内包し、タンパク質の外面を覆うことで、画一的な条件で 10 種類のタンパク質を結晶化した。そのうち、銅と亜鉛を活性部位にもつ Superoxide dismutase I (SOD1)の錯体内包結晶の XAFS を測定した。その結果、SOD1 の活性部位に含まれる亜鉛、銅錯体について配位構造が保持されていることが示された。この知見を元に触媒活性を評価したところ、結晶状態で SOD1 は酵素活性を示し、さらに他のタンパク質との共結晶化によるカスケード反応を実証することができた。XAFS 測定による構造解析の結果を基盤として、かご型錯体への内包を用いた酵素の固定化法の有用性を示すことができた。

3. 背景と研究目的

我々は、これまでに自己集合により形成されるかご型の巨大な金属錯体にタンパク質を内包させ、その錯体の持つ孤立一義空間を用いたタンパク質の機能制御・構造解析を検討してきた。溶液中では、錯体への内包によりタンパク質が安定化されるとともに、変性やリフォールディングの中間体構造など、不安定なタンパク質構造の観測を達成している¹⁻³。本研究では、このかご型錯体へ内包したタンパク質を結晶化することで、タンパク質の固定化法、結晶化法へと応用することを目指した。錯体に内包されたタンパク質は、その周囲を錯体が覆うことで分子間相互作用が規定される。その結果、タンパク質の性質によらず同一の条件で結晶が得られ、タンパク質 X 線構造解析の障壁となっている結晶化を大幅に簡易化する手法として期待される。しかしながら、これまでの X 線回折による錯体内包タンパク質結晶の構造解析では、タンパク質の配向が定まらない(ディスオーダー)のために、タンパク質の結晶構造を得ることができていない。このタンパク質結晶の分析および構造決定のための試料の改善には、放射光を用いた X 線回折によるさらなる解析に加えて、結晶に内包されたタンパク質の構造、状態について他の測定手法での解析が求められていた。

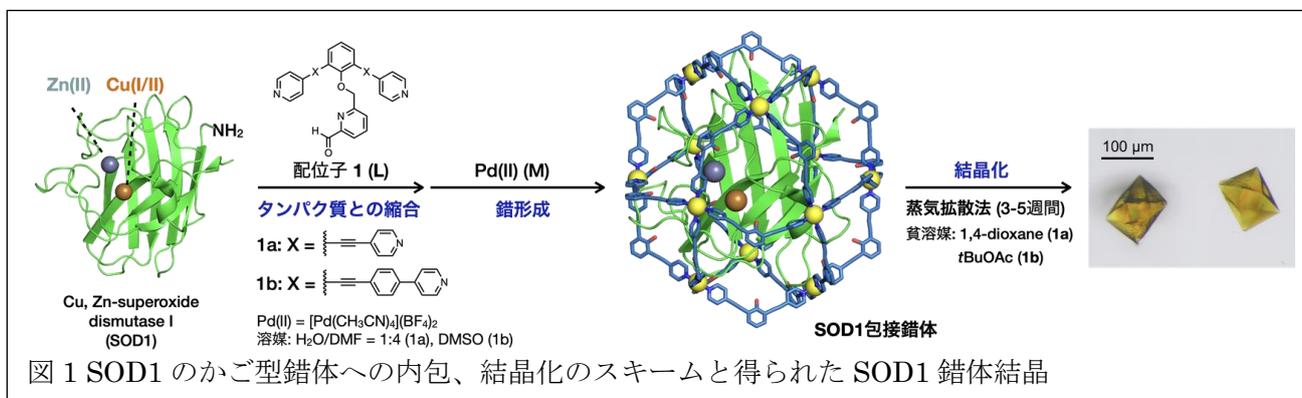
そこで本研究では、かご型錯体の結晶に内包されたタンパク質、特に金属酵素について X 線吸収微細構造(XAFS)測定を行い、内包された酵素の構造を調べることを目的とした。タンパク質活性中心の金属元素について X 線吸収端構造を調べることで、内包された金属酵素の配位環境・構造を明らかにする。かご型錯体内包タンパク質結晶の詳細な XAFS 解析により、X 線回折による構造決定への応用

の足がかりを得る。その知見を結晶化の改良や酵素の不均一触媒としての応用の足掛かりとしてタンパク質の固定化・結晶化法としての有用性を示す。

4. 実験内容

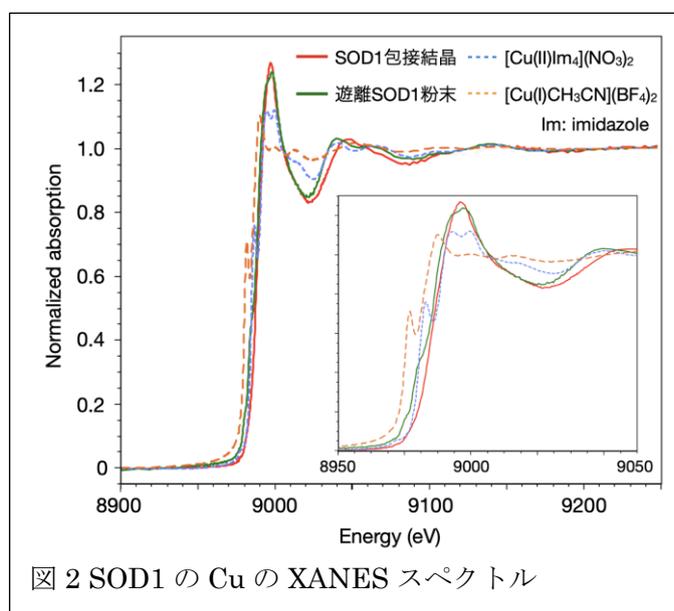
かご型錯体に内包した金属酵素の活性部位について、中心金属錯体の配位構造を XAFS 測定により解析した。具体的には、銅と亜鉛を活性部位にもつ Superoxide dismutase I (SOD1) をかご型錯体に内包、結晶化し、XAFS を測定した。結晶サンプルをガラスキャピラリーに封入して X 線を照射し、蛍光法により XAFS スペクトルを測定した。銅、亜鉛それぞれについて、XANES、EXAFS 領域を解析し、それを錯体に内包していない遊離の SOD1 タンパク質や類似の配位構造を持つ銅、亜鉛と比較することで、その構造を評価した。合わせて蛍光 X 線スペクトルを測定し、かご型錯体を構成するパラジウム Pd(II) イオンと銅、亜鉛イオンの強度比から結晶中の存在比を算出し、タンパク質のかご型錯体結晶への内包率を算出した。

図 1 にタンパク質の内包スキームと SOD1 を内包した錯体結晶を示す。この 100 μm サイズの単結晶を 1 mm 径のガラスキャピラリーに封入し、10 粒程度に対して X 線を照射し、XAFS 解析を行なった。



5. 結果および考察

はじめに、SOD1 の活性中心に含まれる金属元素のうち、銅の XAFS を測定した。XANES スペクトルでは、錯体に内包された結晶と、内包前の SOD1 (市販の凍結乾燥粉末) が良い一致を示した (図 2)。これは、SOD1 の活性中心の銅錯体の配位構造が保持されていることを示唆した。銅 1 価、2 価それぞれの錯体と比較すると、2 価錯体と一致する吸収端を与えたことから、SOD1 の銅イオンは 2 価のまま錯体に内包されたことがわかった。EXAFS 領域を評価すると、k 空間では、錯体結晶中と遊離の SOD1 が同じ周期をもち、概ね同一の形状を与えるスペクトルを与えた (図 3a)。SOD1 の活性部位のヒスチジンの側鎖のイミダゾールが配位した構造をもつ対照の錯体 $[\text{Cu}(\text{II})\text{Im}_4](\text{NO}_3)_2$ (Im: imidazole) についても同様のスペクトルが得られた。R 空間で見ても最初の最大ピークは良い一致を示した (図 3b)。以上より、少なくとも第一配位圏については、錯体結晶内包後も SOD1 は元の構造を保持していることがわかった。一方で、微小な結晶サンプルに対しての測定のために、高波数領域を中心に十分な分解能が得られなかった。そのため、第二配位圏以降について観測された差については、議論が困難だと考えられる。



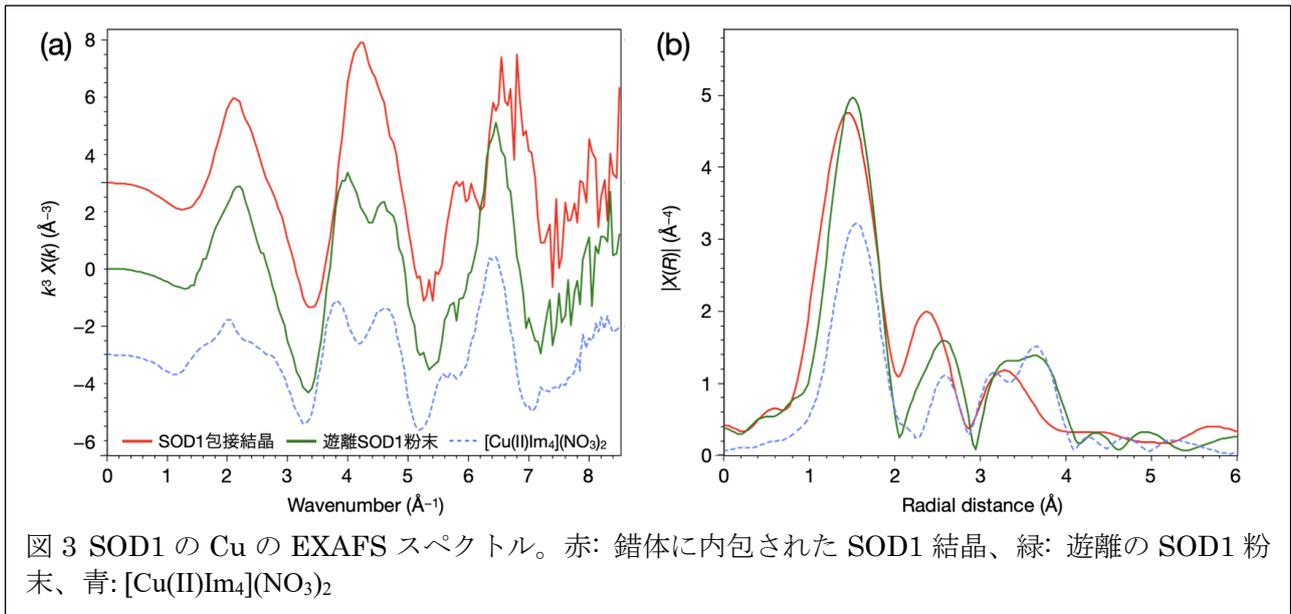


図3 SOD1のCuのEXAFSスペクトル。赤: 錯体に内包されたSOD1結晶、緑: 遊離のSOD1粉末、青: $[\text{Cu(II)Im}_4](\text{NO}_3)_2$

亜鉛についても同様にXAFSを解析した。XANESスペクトルでは、錯体結晶中のSOD1は遊離のSOD1と形状の差が見られるものの、吸収端は完全に一致していた(図4)。EXAFSスペクトルでは、良い一致が見られ、銅と同様に錯体結晶内のSOD1は、遊離タンパク質、類似のイミダゾールの亜鉛錯体 $[\text{ZnIm}_4](\text{AcO})_2$ と第一配位圏が合致した。以上より、銅、亜鉛錯体から構成されるSOD1の活性中心の構造が錯体結晶へ内包後に保持されていることが示された。主に第一配位圏の構造の比較に留まったものの、同様の配位様式で活性構造が保持されていることが示唆された。

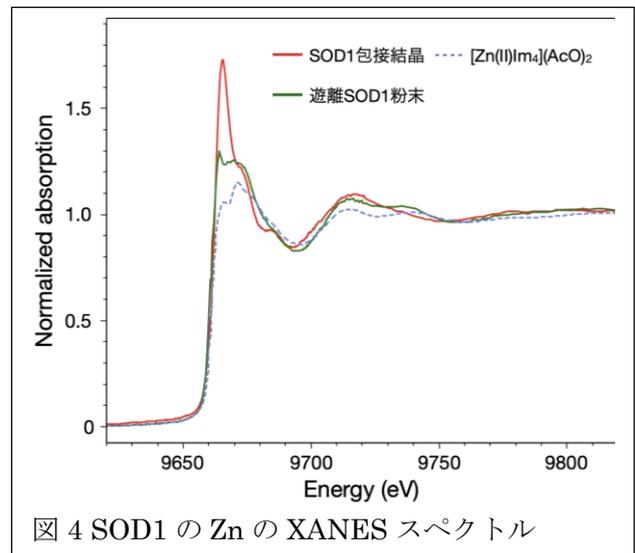


図4 SOD1のZnのXANESスペクトル

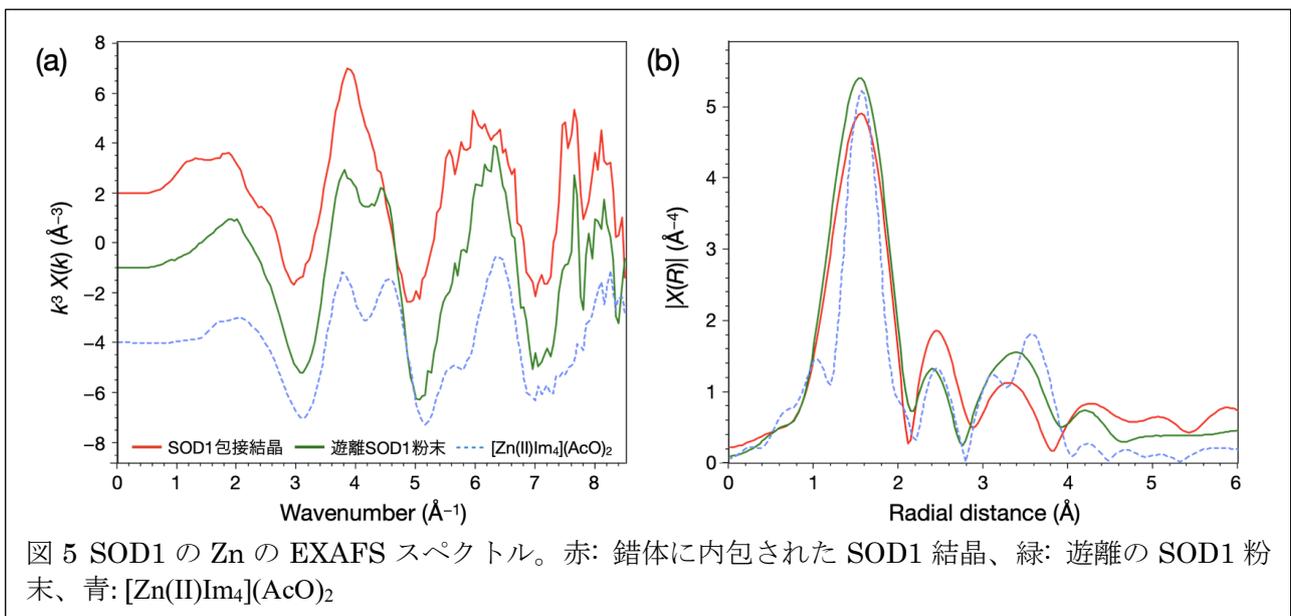


図5 SOD1のZnのEXAFSスペクトル。赤: 錯体に内包されたSOD1結晶、緑: 遊離のSOD1粉末、青: $[\text{Zn(II)Im}_4](\text{AcO})_2$

さらに、蛍光 X 線スペクトルから Pd, Cu, Zn 三元素の存在比を求めることで、内包されたタンパク質とかご型錯体の比を求めた。Pd を励起する 25 keV の X 線を照射し、検出される蛍光強度を理論値と比較した。その結果、Cu と Zn の強度、面積比は、かご型錯体全てに SOD1 が内包された 1:1 の場合の 6 割程度であった。つまり、結晶中のかご型錯体の 6 割を SOD1 が占めていることが示された。多孔性材料へのタンパク質の担持量としては高い値だが、単結晶構造解析手法としては内包率の向上が求められる。

この XAFS 解析、蛍光 X 線スペクトル測定の結果をもとに、錯体結晶に内包されたタンパク質の酵素活性を測定した。SOD1 のスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)の不均化能を測定すると、結晶に内包した状態でも高い酵素活性を示した。さらに、シトクロム c との共結晶化し、2 つの酵素を用いたカスケード反応を行うと、独立した酵素の固定化よりも 4.2 倍の反応速度の向上が見られた。これは、共結晶化したことによる酵素の近接により連続した反応速度が加速されたと言える。以上より、かご型錯体への内包、結晶化は、タンパク質の固定化法として活用できることが示された。

6. 今後の課題

今回の測定の結果、SOD1 については、その活性構造を保持したまま錯体結晶に担持されていたことがわかり、酵素の担持法としての応用を見出すことができた。一方で、タンパク質の結晶化法として、単結晶 X 線回折へと応用するためには、さらなる試料の改良が求められる。内包率を増加させるだけでなく、タンパク質の結晶中での配向をそろえて回折像を得るために、錯体を構成する配位子の設計や結晶化条件を検討していく予定である。

7. 参考文献

1. R. Ebihara, T. Nakama, K. Morishima, M. Yagi-Utsumi, M. Sugiyama, D. Fujita, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2025**, 64, e202419476.
2. T. Nakama, A. Rossen, R. Ebihara, M. Yagi-Utsumi, D. Fujita, K. Kato, S. Sato, M. Fujita, *Chem. Sci.* **2023**, 14, 2910–2914.
3. D. Fujita, R. Suzuki, Y. Fujii, M. Yamada, T. Nakama, A. Matsugami, F. Hayashi, J.-K. Weng, M. Yagi-Utsumi, M. Fujita, *Chem* **2021**, 7, 2672–2683.