解説

# Isothermal Titration Calorimetry を用いた 酵素に対する金属イオンの相互作用解析

判谷 吉嗣<sup>a,b</sup>, 千賀 明香音<sup>b</sup>, 河合 富佐子<sup>c</sup>

<sup>a</sup>日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所
 <sup>b</sup>京都府立大学大学院 生命環境科学研究科
 <sup>o</sup>岡山大学

(受取日:2019年9月13日,受理日:2019年10月15日)

## Analysis of Metal Ion Binding to Enzyme Using Isothermal Titration Calorimetry

Yoshiji Hantani<sup>a,b</sup>, Akane Senga<sup>b</sup>, and Fusako Kawai<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Central Pharmaceutical Research Institute, Japan Tobacco Inc. <sup>b</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University <sup>c</sup> Emeritus Professor, Okayama University

(Received Sep. 13, 2019; Accepted Oct. 15, 2019)

Metal ions play essential roles in protein structures, function, and stability. Practically, over one third of proteins from Protein Data Bank (PDB) contain metal ions, and approximately 40 % of enzymes for which three-dimensional structures are known required metal ions for their activities. Metal ions play roles as cofactors for enzymes and regulate functions of enzymes by binding to the enzymes, except as cofactors. Therefore, knowledge of metal-enzyme interactions is essential for elucidating the function and reaction mechanism of enzymes. Metal-binding has been identified by such experimental approaches as isothermal titration calorimetry (ITC), circular dichroism, differential scanning calorimetry, absorbance spectroscopy, and X-ray. Among them, ITC is particularly a fundamentally essential technique to study metal-enzyme interactions, because it can reliably assess the thermodynamic underpinnings of binding events, and it is not restricted by the photophysical properties of a metal. In this review, we highlight the analysis of enzyme-metal interactions based on ITC about two enzymes, carbonic anhydrase II (CAII) and cutinase-like enzyme (Cut190), in which metal ions are playing different roles as a cofactor and activating/stabilizing factors, respectively. We evaluate and elucidate analytical results and propose the additional plans, which complement ITC in case metal binding is too weak for reliable assessment.

Keywords: Isothermal titration calorimetry, Metal-enzyme interaction, carbonic anhydrase II, Cut190

### 1. はじめに

蛋白質は20のアミノ酸からなり,その機能は,構成する アミノ酸の種類,コファクターとの相互作用,金属イオン の結合,および他の蛋白質との相互作用などにより決定さ れる。蛋白質を形成するアミノ酸の側鎖の化学的な性質が 蛋白質の構造や機能の一部を決定する。また,低分子化合 物や金属イオンのようなコファクターは,蛋白質に結合し て,その機能を決定づける要因となっており,金属イオン は求核反応,構造変化,電子伝達や蛋白質構造の安定化な ど,様々な形で蛋白質機能に重要な役割を果たしている。 Protein Data Bank (PDB) に登録されている蛋白質の3分の1は,その機能に重要な金属イオンを有している。<sup>1)</sup>また,動植物の細胞内では30-40%の蛋白質が,一つ以上の金属を利用しており,生物機能を果たしている。これらの蛋白質は,病気の進行にも関与しており,筋萎縮性側索硬化症 (ALS),パーキンソン病,アルツハイマー病のような脳疾患の進行および老化やアポトーシスに大きな影響を及ぼす。<sup>2,3)</sup>植物では,動物に比べて金属の吸収能力が高く,<sup>4)</sup> metallothionein や phytochelatin のような金属結合蛋白質が代謝や解毒に関わっている。<sup>5)</sup>また,多くの金属結合蛋白質が光合成の電子伝達系に関与している。<sup>6)</sup>

2

生体反応を司る酵素蛋白質は、その多くがナトリウム、 銅、マグネシウム、マンガン、鉄、カリウム、亜鉛などの 金属イオンを内部に取り込んで、自身の安定性を向上し、 触媒機能を発揮する。<sup>7)</sup>実際に、構造解析が行なわれてい る酵素の約 40%が活性中心に金属を有している。<sup>8)</sup>その ため、金属イオンの結合や寄与について理解することは、 酵素の機能や安定性、フォールディングを解明する上で重 要である。さらに、金属イオンの利用は、酵素高機能化の 一つの方法となる場合もある。

このように、金属イオンは酵素に結合して機能を発揮 することから、その結合部位、結合数、親和性、熱力学量 (エンタルピー変化( $\Delta H$ )、およびエントロピー変化( $\Delta S$ )) の解析は、金属イオンの酵素反応における機能解析にとっ て極めて重要な情報となる。金属イオンの結合を調べる方 法には、計算機化学による結合部位予測と、実験による結 合解析がある。

計算機化学による結合部位予測の精度は、近年非常に向 上している。金属イオンと蛋白質のアミノ酸との結合を予 測する方法は2種類に分類される。一つ目は,蛋白質の三 次元立体構造が解明されている場合に、それを利用して金 属イオンの結合部位を予測する方法で、正確性が高い。 Joost らは分子力場計算の一つである Fold-X force field アル ゴリズムを用いて, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>の結合残基を予 測し, 90-97%の正確性を示している。9 その他にも種々 の方法が開発され、好成績が得られている。10,11) 二つ目は、 三次元立体構造が解明されていない蛋白質について、アミ ノ酸配列の情報から結合部位を予測する方法である。この 方法は、一般的に予測の正確性が低いが、あらゆる蛋白質 に対して予測が可能である。人工ニューラルネットワーク を用いた方法で、1018 の蛋白質に対して Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>の結合を予測した例や,<sup>12)</sup> 機械学習の分野 で広く使用されている support vector machine (SVM) アル ゴリズムを用いて、良好な結果を示した例 13) が報告され ている。

実験による結合解析には、X線構造解析、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR), 金属イオンアフニ ティクロマトグラフィー,ゲルシフトアッセイ,質量分析, 等温滴定型カロリメトリー (Isothermal Titration Calorimetry: ITC), 遠紫外円偏光二色性 (far-UV Circular Dichroism: far-UVCD) スペクトル,示差走査熱量計 (Differential Scanning) Calorimetry: DSC) などが用いられる。その中でも, ITC は 親和性を求める方法として有効である。ITCは1990年代に 高感度化され、現在では、結合における熱力学量を測定す る標準的な測定器となっており、14)これを利用することに より, 蛋白質 - 蛋白質, 蛋白質 - DNA, レセプター-リガン ドのような分子間相互作用の熱力学量を、比較的簡便に測 定することが出来る。15) ITC は反応により生じる熱量を測 定するため、金属イオンの測定に理想的な方法と言えるだ ろう。例えば, Zn<sup>2+</sup>は d<sup>10</sup> 電子配置を取るため, 通常の分光 学的手法では測定が難しいとされている。しかし, ITC を 用いると直接的かつ定量的な測定が可能となる。このよう に、ITC は金属イオンの蛋白質に対する結合の解析に有用 で、X線構造解析、NMR解析、あるいは計算機化学による 結合部位解析を組み合わせることで、金属イオンの分子間 相互作用をより詳細に解釈することが可能となる。

本稿では、ITC を用いた酵素に対する金属イオン結合の 解析例として金属イオンの役割の異なる 2 つの酵素 carbonic anhydrase II (CAII) および Saccharomonospora viridis AHK190 由来 cutinase 様酵素 Cut190 に対する金属イ オンの結合解析を取り上げる。これらの結果から、ITC を 基本とした酵素-金属イオン相互作用の解析の有用性と限 界、および対策について解説する。

#### 2. 金属イオンの結合解析例

ITC を用いた金属イオンの解析の成功例として,活性中 心に補因子として金属を有する CAII および活性中心に金 属を有しない金属イオン要求性酵素として Cut190 を取り 上げて解説する。

#### 2.1 CAIIに対する金属イオンの結合解析

CAIIは、すべての生物にユビキタスに存在しており、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)の水和および逆反応である炭酸水素イオン

(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の脱水反応を触媒する酵素である。二酸化炭素を 炭酸水素イオンと水素イオン(H<sup>+</sup>)に変換する可逆的な反 応は、式(1)と(2)の2段階の反応からなり(Fig.1)、そ の中心的な反応は、二酸化炭素と亜鉛に結合した水酸イオ ン(OH<sup>-</sup>)から炭酸水素イオンを生成する反応である。CAII の活性中心は、10個の $\beta$ -sheetの中心にあり、亜鉛イオン

(Zn<sup>2+</sup>)を有する(**Fig.2**)。Zn<sup>2+</sup>は His94,96,119と直接配 位し,それらの His は,それぞれ Gln92,Asn244,Glu117と 相互作用している。また,Thr199と水素結合を形成する水 酸化物イオンにより,亜鉛の配位圏が満たされている。活 性中心から離れた位置にある His64 は,金属に結合した H<sup>+</sup> をバッファーに移動させる役割(proton-shuttle と呼ばれる 現象)を果たしている。

CAII は、Zn<sup>2+</sup>以外にCo<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>などのイオンが結合することが知られているが、その中では、Co<sup>2+</sup>のみが酵素活性を発揮する (Zn<sup>2+</sup>:  $k_{cat}/K_m$  8.7 × 10<sup>-7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, Co<sup>2+</sup>:  $k_{cat}/K_m$  8.8 × 10<sup>-7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)。<sup>16</sup>

DiTusa らは, ITC を用いて Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>の熱力学的 解析を実施した。<sup>17)</sup> その結果, Co<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>は CAII に 1:1 で 結合し、Cu<sup>2+</sup>は1:2で結合していることが明らかになった。 Cu2+の 2 つ目の結合に関しては、活性中心入口の His4 と His64 部位に結合していると予測されている。得られた熱 力学量を Fig.3 に示す。エンタルピー変化量(ΔH) に関し ては Co<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup>の順に大きい値を示した。この順序 は、金属の水和のエンタルピー変化量と逆相関しており、 蛋白質との結合のエンタルピーだけでなく、溶媒による水 和の影響が大きい事を示している。通常、金属イオンの蛋 白質への結合は、脱溶媒和のため吸熱反応になることが多 いが、CAIIにおいては発熱反応であり、3つのHisのイミ ダゾールと金属との配位の結合の強さが要因と考えられる。 さらに、 $種 < の 温度 で \Delta H を 測定 し 熱容 量変 化 (\Delta C_p) を 算$ 出したところ, Zn<sup>2+</sup>は-489.5 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>は, そ れぞれ 4.2 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, -238.5 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> であり, Zn<sup>2+</sup>結合 による脱溶媒和の影響は、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>に比較して大きいこと が明らかとなった。酵素活性は Zn<sup>2+</sup>以外では Co<sup>2+</sup>のみに認 められているが、これは Co<sup>2+</sup>は唯一 Zn<sup>2+</sup>と同様に pH 8 付 近で四面体配位をとるためと考えられている。また、今回 の ΔH と ΔCp の結果から,水の動きも関与していると推測 される。

さらに DiTusa らは, His94 および  $Zn^{2+}$  と相互作用してい るアミノ酸 (Gln92, Thr199, Glu117)を Ala に変換した変 異体を作製し, ITC を用いて  $Zn^{2+}$ の結合解析を行った。<sup>18)</sup> すべての変異体は野生型よりも親和性が低下しており, His ( $Zn^{2+}$ と直接配位する残基)と Gln92, Thr199, Glu117 の相互作用により, His 側鎖の imidazole と金属イオンの距 離や方向性が保たれ,適切な静電相互作用を獲得できるこ とが示唆された。 特 集 - バイオカロリメトリー -

$$CO_{2} + (CA)Zn^{2+}(OH^{-}) \rightleftharpoons (CA)Zn^{2+}(HCO_{3}^{-}) \rightleftharpoons (CA)Zn^{2+}(OH_{2}) + HCO_{3}^{-}$$
(1)  
(CA)Zn^{2+}(OH\_{2}) \rightleftharpoons (CA)Zn^{2+}(OH^{-}) + H^{+} (2)

**Fig.1** Catalytic mechanism of CAII. Catalytic turn-over starts with the nucleophilic attack of the carbon atom of  $CO_2$  by a Zn-bound hydroxide ion to generate a zinc-bound bicarbonate complex, which then dissociates from the metal site allowing an additional water to coordinate (equation 1). The bound water is deprotonated rapidly, with the aid of a localized base, to regenerate the catalytic zinc-hydroxide species (equation 2).



**Fig.2** Structure of CAII. a) Schematic drawing of the structure of CAII (PDB code; 2CBA). Metal ion binding sites of CAII and proton-shuttling residue, His64 are drawn as stick, and the  $Zn^{2+}$  ions are drawn as spheres. b) Schematic drawing of the direct and indirect metal ligands in the CAII zinc binding site.



**Fig.3** ITC profiles of metal ion binding to CAII. Thermodynamics of metal ion binding to Cut190\*Ser176Ala was obtained by ITC. The gray, white, and black bars indicate the results for  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$ , respectively. Data of  $Cu^{2+}$ represent values for the high-affinity sites. (Modified from Ref. 17, DiTusa *et al.*, 2001)

DiTusa らの報告の後, Zn<sup>2+</sup>の結合解析について, さらに いくつかの報告が行われている。例えば, Song らにより, 金属フリーにするため, dipicolinic acid で処理した CAII に 対する Zn<sup>2+</sup>の結合解析が報告された。<sup>19)</sup> これは, バッファ ーと Zn<sup>2+</sup>複合体の解離などを加味した解析<sup>20)</sup>を行ったも ので, Zn<sup>2+</sup>の結合比は 1, 結合定数 ( $K_a$ 値) は 2.2×10<sup>9</sup> M と 示された。DiTusa らの  $K_a$ 値 1.2×10<sup>12</sup> M より弱い値である ものの, 同様に強固な複合体を形成していることが示され ている。また, Avvaru らにより, 金属フリーと Zn<sup>2+</sup>結合型 の CAII の結晶構造に変化はないが, DSC と CD を用いた 熱安定性の解析により, Zn<sup>2+</sup>結合により 8℃ 安定化するこ と, 熱変性は β-sheet 構造から起こり, その後, α-helix が変 性することが明らかとなっている。<sup>21)</sup>

CAII 以外にも,活性中心への金属イオンの結合解析として, *E. coli* alkaline phosphatase に対する  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ の結合,<sup>22)</sup> flap endonuclease に対する  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ の結合,<sup>23)</sup> ある いは glyoxalase I に対する  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ 等の結合 <sup>24)</sup> などの報告があり,いずれも ITC による測定で金属イオンの結合数 や熱力学量が求められた。このように ITC 解析は,金属を補因子とする酵素において金属イオンの結合に関する不可

欠な情報を与えるが,さらに,X線構造解析やDSC,CDの 情報,また,金属結合部位の変異体を用いた結合,活性の 情報などを組み合わせることにより,より詳細な解析が可 能になる。特にCAIIは,金属周辺の水やアミノ酸の動き, プロトンの出入りなどの解析など,金属イオン結合の熱力 学的解析や動的解析の成功例として,他の酵素にも参考と なる情報が多く得られている。

#### 2.2 Cut190 に対する金属イオンの結合解析

Cut190 は, 耐熱性放線菌 Saccharomonospora viridis AHK190 より単離された, carboxylic ester hydrolase (EC3.1.1) ファミリーの一員である cutinase 様酵素である。<sup>25)</sup> Ca<sup>2+</sup> が活性化と熱安定性に不可欠であるものの, Ca<sup>2+</sup>は活性 中心に補因子として存在せず, 酵素タンパク表面に結合 する。Cut190 の高機能化変異体である Cut190 Ser226Pro/Arg228Ser (Cut190\*) は, 1-5 mM Ca<sup>2+</sup>存在下で 酵素活性が最大となり, 熱安定性は Ca<sup>2+</sup>濃度依存的に向上 する。また, 活性中心の Ser (触媒三残基の一つ)を Ala に 置換した不活性型変異体である Cut190\*Ser176Ala の X 線 結晶構造解析と質量分析から, Ca<sup>2+</sup>が結合する Sites 1-3 が 明らかとなっており(**Fig.4**), Site 1 は酵素活性, Site 2 は 酵素の熱安定性に寄与することが示されている。<sup>26,27)</sup>

Senga らは、酵素の安定性と機能に与える Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の影響について解析を実施した。<sup>28)</sup> ITC を用い て、Cut190\*Ser176Ala に対する Ca<sup>2+</sup>の結合を検討したもの の熱量変化を検出することは出来ず、Ca<sup>2+</sup>の結合親和性は 極めて弱いと考えられた。そこで、他の2価イオンである Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> について, Cut190\*Ser176Ala への影響が 検討された。その結果、再現性よく熱量変化が観測され、 いずれもエントロピー駆動型の吸熱反応を示し、これは金 属の結合に伴う脱溶媒和によるものと考えられた(Fig.5)。 Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の結合比は ほぼ1で, Zn<sup>2+</sup>の結合比は, ほぼ3 であった。Zn<sup>2+</sup>の結合解析において、3つの結合を区別する ことは難しいことから、1 サイト結合モデルにより結合親 和性が算出された。Mn<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の Ka 値は 10<sup>5</sup> オーダーとな り, Mg<sup>2+</sup>の 10<sup>4</sup> オーダーより強い値を示した。また, いず れの結合も, unfavorable なエンタルピー変化と favorable な エントロピー変化を示した。

各種金属イオン存在下での活性を測定した結果,  $Zn^{2+}$ 存 在下での活性は,他の金属イオンに比較して非常に低かっ た。また,0.25 mM  $Mn^{2+}$ は,2.5 mM  $Ca^{2+}$ に匹敵する活性を 示したが,高濃度 (25 mM  $Mn^{2+}$ ) で活性が消失した。2.5 mM  $Mg^{2+}$ では,活性が 40%に減弱した (**Table 1**)。Kinetic parameter については, $Mn^{2+}$ を用いた際の $K_m$  値と  $k_{cat}$  値は,  $Ca^{2+}$ を用いた時よりも約3倍大きく, $k_{cat}/K_m$  値は, $Ca^{2+}$ が 3.08 × 10<sup>5</sup>  $M^{-1}$  s<sup>-1</sup>,  $Mn^{2+}$ が 4.21 × 10<sup>5</sup>  $M^{-1}$  s<sup>-1</sup> であり,両者で 同等であった。

結晶構造(PDB code: 5ZRQ)においては, Site 1には Ca<sup>2+</sup>, Site 2,3 には Zn<sup>2+</sup>が結合しているが, これまでに Zn<sup>2+</sup>が Site 1に結合した結晶は得られていない。ITCの結果から, Zn<sup>2+</sup>の結合比は ほぼ 3 であったが, Zn<sup>2+</sup>は Site 1 には 結合できず, Site 2,3 とその他のサイトに結合するため, 活性を発現できないと考えられた。一方, 0.25 mM Mn<sup>2+</sup>あ るいは 2.5 mM Ca<sup>2+</sup>存在下では、金属イオン(Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) が Site 1 に結合し、構造変化を誘起して活性を発現できる と推察された。Mn<sup>2+</sup>の結合比は ほぼ 1 であったが, 負に チャージした Glu220, Asp250, Glu296 によって構成された Site 2 に強く結合し, Site 1,3 には Ca<sup>2+</sup>と同様に弱く結合す ることで活性を発現すると考えられる(これらの結合は ITC では測定できない)。Mg<sup>2+</sup>も Ca<sup>2+</sup>や Mn<sup>2+</sup>と同様の結合 を示していると推定される。これらの金属イオンの結合挙 動については、計算機化学の手法の一つである液体の統計 力学に基づく 3D reference interaction site model (3D-RISM) 法を用いた解析においても、同様の結果が裏付けられてい

CD を用いた熱安定性試験の結果から、金属フリーの変 性中点温度( $T_m$  値)は、53.6°Cであった。0.25 mM  $Mn^{2+}$ と 0.25 mM  $Zn^{2+}$ 存在下での $T_m$  値(0.25 mM  $Mn^{2+}$ : 62.7 °C,およ び 0.25 mM  $Zn^{2+}$ : 61.1 °C)は 0.25 mM  $Ca^{2+}$ (59.6 °C)より高 く、0.25 mM  $Mg^{2+}$ 存在下での $T_m$  値(56.2 °C)は 0.25 mM  $Ca^{2+}$ より低かった。金属イオン濃度と蛋白質の安定性の相 関は、 $Ca^{2+}$ が最も高く、高濃度(25 mM)の $Ca^{2+}$ (67.8 °C) は、他の金属イオンよりも高い熱安定性を示した。

Ca<sup>2+</sup>以外の金属イオンは高濃度条件で活性を示さなかっ たが、ITC および CD の結果から、高濃度では結合が飽和 し、分子内の相互作用を強め、蛋白質の安定性は増加する ものの、動きが制限されることにより、酵素活性は減弱す るためと考えられた。さらに金属の濃度を上げると、蛋白 質の凝集が誘起されると推定された。弱いバインダーであ る Ca<sup>2+</sup>は、広い濃度範囲において Cut190 の構造的な特性 を制御するのに有利と考えられる。一方、強いバインダー である Mn<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>は、Ca<sup>2+</sup>よりも動きを大きく制限して蛋 白質の安定性を高めるものの、活性はむしろ弱められると 考えられる。このように、金属イオンは結合に伴う構造変 化により、機能を制御していると考えられた。

Cut190の研究では,直接 Ca<sup>2+</sup>の結合を ITC で解析できな かった。弱い結合の検出は ITC の不得意とするところであ る。しかし, Ca<sup>2+</sup>以外の結合可能な 2 価金属イオンを ITC で解析した結果や,それらの活性に対する影響を総合的に 考察することにより, Ca<sup>2+</sup>の結合を推測することが可能と なった。このような方法の他に,弱い親和性の金属イオン の結合を解析する方法として,一つの金属イオンを別の金 属イオンで置換する方法がある。これは二つの金属の熱力 学量の差を利用したもので,熱力学量が知られている金属 を,測定したい金属と蛋白質の混合物に滴下し,目的とす る金属の熱力学量を算出する方法である(置換法)。<sup>29)</sup> Oda らは, HIV RNase H に対する Mg<sup>2+</sup>の結合を,置換法により 計測している。<sup>30)</sup>

結合が弱く,直接に対象金属イオンの結合をみることが できない場合は,HIV RNase H で用いられたような置換法 を用いるか,Cut190のように結合のより強い金属イオンの 結合を計測しX線構造解析から対象金属イオンの結合を演 繹することにより解析が可能である。さらに,ニュートン の運動方程式を繰り返し計算し,原子,分子の静的・動的 な構造や動的過程を解析する分子動力学(molecular dynamics: MD)シミュレーションや3D-RISM 法のような計 算手法を組み合わせて予測を行うことで演繹結果はより裏 付けられると考えられる。

このように ITC は、金属イオンが酵素の活性中心外に弱 く結合し、活性や安定性をコントロールしている場合につ いても有用な分析手段である。Cut190 以外にも、Cu/Znsuperoxide dismutase (SOD1)のホモダイマー化に寄与して いる Zn<sup>2+</sup>の結合<sup>31)</sup> や、*Agkistrodon acutus* 由来の NADase の 6 つの阻害部位に結合する Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>等の解析 <sup>32)</sup> で、ITC が有効であったと報告されている。

#### 3. まとめ

本稿では、金属イオンの結合解析例として金属イオンを 補因子として活性中心に結合している CAII および金属イ オンを活性中心に保有しないが、金属イオンにより活性と 安定性が制御される Cut190 を選んで解説した。金属イオン の機能解析には ITC による結合解析が不可欠であることは 言うまでもなく、CAII はいわば典型的な成功例である。他 方, Cut190のように, 直接的に Ca<sup>2+</sup>イオンの結合を ITC で は測定できない場合もある。このような場合でも他の金属 イオンとの結合を ITC で測定するような工夫と同時に MD シミュレーションや 3D-RISM 法のような計算手法を組み 合わせることにより,詳細な機能解析が可能になると考え られる。いずれにしても金属イオンの結合解析において ITC が重要な測定手法であることに変わりはなく, ITC か ら得られる熱力学パラメータ、親和性、結合比などの情報 は、水分子の出入りや分子レベルでの相互作用を理解する 上で必須である。

最後に、金属イオンの測定は、溶解性、希釈熱、緩衝液 との相互作用など、考慮すべき点が多くあり、実施に当た っては特にバッファーの選択が重要であることを指摘して おく。これに関しては金属-バッファー相互作用に関する 報告例を参照して頂きたい。<sup>33,34)</sup>



**Fig.4** Overall structure of Cut190\*Ser176Ala. Metal ion binding sites of Cut190\*Ser176Ala (PDB code; 5ZNO) are drawn as cartoon, and the  $Ca^{2+}$  ions (Sites 1-3) are drawn as spheres. The metal ion binding sites are indicated as Sites 1-3 with the residues forming the sites shown as stick models. The active triad (Ser176Ala, Asp222, and His254) is also represented as stick model.

2019)



 Table 1
 Activity of Cut190\* in a various metal ions.

Metal ion	Metal ion Conc. (mM)	Relative activity (%)
$Ca^{2+}$	2.5	100
Mn <sup>2+</sup>	0.025	3.5
	0.25	86.0
	2.5	69.3
	25	0.0
Zn <sup>2+</sup>	0.025	10.4
	0.25	6.5
$Mg^{2+}$	0.25	10.1
	2.5	39.3
	25	8.3

Hydrolysis activities of Cut190\* towards poly(butylene succinate-*co*-adipate) (PBSA) were measured in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) in the presence of metal ion at 37 °C. Relative activities compared to the activity in the presence of 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> are shown. (Modified from Ref. 28, Senga *et al.*, 2019)

辞

Fig.5 ITC profiles of metal ion binding to Cut190\*Ser176Ala.

Thermodynamics of metal ion binding to Cut190\*Ser176Ala was obtained by ITC. The gray, white, and black bars indicate the results for

Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup>, respectively. (Modified from Ref. 28, Senga et al.,

謝

Cut190 研究の遂行にあたり多大なご指導をいただき,また,本稿の執筆の機会をいただきました京都府立大学 織田 昌幸 教授に深く感謝いたします。

#### 文 献

- C. H. Lu, Y. F.Lin, J. J. Lin, and C. S. Yu, *PLoS ONE* 7, e39252 (2012).
- E. Gaggelli, H. Kozlowski, D. Valensin, and G. Valensin, Chem. Rev. 106, 1995-2044 (2006).
- A. Lothian, D. J. Hare, R. Grimm, T. M. Ryan, C. L. Masters, and B. R. Roberts, *Front Aging Neurosci* 5, 35 (2013).
- 4) E. Fosso-Kankeu and A. F. Mulaba-Bafubiandi, *Phys Cheme Earth, Parts A/B/C* 67-69, 242-252 (2014).
- 5) C. Cobbett and P. Goldsbrough, Annu Rev Plant Biol 53, 159-182 (2002).
- 6) I. Yruela, *Metallomics* 5, 1090-1109 (2013).
- 7) J. A. Cowan, Chem. Rev. 98, 1067-1088 (1998).
- G. L. Holliday and J. M. Thornton, J. Biol. Inorg. Chem. 13, 1201-1218 (2008).
- 9) J. W. Schymkowitz, F. Rousseau, I. C. Martins, J. Ferkinghoff-Borg, F. Stricher, and L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10147-10152 (2005).
- 10) V. Sobolev and M. Edelman, Isr. J. Chem. 53, 166-172 (2013).

- J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, and Y. Zhang, Nat. Methods 12, 7-8 (2015).
- 12) J. S. Sodhi, K. Bryson, L. J. McGuffin, J. J. Ward, L. Wernisch, and D. T. Jones, J. Mol. Biol. 342, 307-320 (2004).
- 13) H. H. Lin, L. Y. Han, H. L. Zhang, C. J. Zheng, B. Xie, Z. W. Cao, Y. Z. Chen, *BMC bioinformatics* 7 Suppl 5, S13 (2006).
- 14) A. Velazquez-Campoy, H. Ohtaka, A. Nezami, S. Muzammil, and E. Freire, *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17, Unit 17.18 (2004).
- W. H. Ward and G. A. Holdgate, *Prog Med Chem* 38, 309-376 (2001).
- 16) K. A. Kogut and R. S. Rowlett, J. Biol. Chem. 262, 16417-16424 (1987).
- 17) C. A. DiTusa, T. Christensen, K. A. McCall, C. A. Fierke, and E. J. Toone, *Biochemistry* **40**, 5338-5344 (2001).
- 18) C. A. DiTusa, K. A. McCall, T. Christensen, M. Mahapatro, C. A. Fierke, and E. J. Toone. *Biochemistry* 40, 5345-5351 (2001).
- 19) H. Song, D. L. Wilson, E. R. Farquhar, E. A. Lewis, and J. P. Emerson, *Inorg Chem* **51**, 11098-11105 (2012).
- 20) N. E. Grossoehme, S. Akilesh, M. L. Guerinot, and D. E. Wilcox, *Inorg Chem* 45, 8500-8508 (2006).
- 21) B. S. Avvaru, S. A. Busby, M. J. Chalmers, P. R. Griffin, B. Venkatakrishnan, M. Agbandje-McKenna, D. N. Silverman, and R. McKenna *Biochemistry* 48, 7365-7372 (2009).
- 22) C. L. Wojciechowski, and E. R. Kantrowitz, J. Biol. Chem. 277, 50476-50481 (2002).
- 23) M. Feng, D. Patel, J. J. Dervan, T. Ceska, D. Suck, I. Haq, and J. R. Sayers, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 450-456 (2004).
- 24) S. L. Clugston, R. Yajima, and J. F. Honek, *Biochem. J.* 377, 309-316 (2004).
- 25) F. Kawai, T. Kawabata, and M. Oda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 4253-4268 (2019).
- 26) N. Numoto, N. Kamiya, G. J. Bekker, Y. Yamagami, S. Inaba, K. Ishii, S. Uchiyama, F. Kawai, N. Ito, and M. Oda, *Biochemistry*, **57**, 5289-5300 (2018).
- 27) M. Oda, Y. Yamagami, S. Inaba, T. Oida, M. Yamamoto, S. Kitajima, and F. Kawai, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10067-10077 (2018).
- 28) A. Senga, Y. Hantani, G. J. Bekker, N. Kamiya, Y. Kimura, F. Kawai, and M. Oda, *J. Biochem.* **166**, 149-156 (2019).
- 29) M. C. Carpenter, A. Shami Sha, S. DeSilva, A. Gleaton, A. Su, B. Goundie, M. L. Croteau, M. J. Stevenson, D. E. Wilcox, and R. N. Austin, *Metallomics* 8, 605-617 (2016).
- 30) M. Oda, Z. Xi, S. Inaba, R. L. Slack, and R. Ishima, *J Therm Anal Calorim* 135, 2647-2653 (2019).
- 31) S. Z. Potter, H. Zhu, B. F. Shaw, J. A. Rodriguez, P. A. Doucette, S. H. Sohn, A. Durazo, K. F. Faull, E. B. Gralla, A. M. Nersissian, and J. S. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 4575-4583 (2007).
- 32) X. Xu, L. Zhang, Z. Luo, D. Shen, H. Wu, L. Peng, J. Song, and Y. Zhang, *Metallomics* 2, 480-489 (2010).
- 33) R. M. Smith, A. E. Martell, and R. J. Motekaitis, NIST Standard Reference Database 46, Version 7.0 (2004).
- D. Wyrzykowski, B. Pilarski, D. Jacewicz, and L. Chmurzyński, *J Therm Anal Calorim* 111, 1829-1836 (2013).



判谷 吉嗣 Yoshiji Hantani E-mail: yoshiji.hantani@jt.com



千賀 明香音 Akane Senga E-mail: s818631027@kpu.ac.jp



河合 富佐子 Fusako Kawai E-mail: fkawai@okayama-u.ac.jp