
筋小胞体カルシウムポンプの ATP 加水分解とカルシウム輸送の共役機構

(14580619)

平成 14 年度~平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成 16 年 5 月

研究代表者 大保 貴嗣
(旭川医科大学医学部助教授)

は し が き

研究組織

研究代表者： 大保 貴嗣 (旭川医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,200	0	2,200
平成 15 年度	1,500	0	1,500
総計	3,700	0	3,700

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki

Remarkable stability of solubilized and delipidated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with tightly bound fluoride and magnesium against detergent-induced denaturation

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, No. 16, 2002, April 19

2. 大保 貴嗣、山崎 和生、王 国麗、Danko Stefania、鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseのAドメインー膜貫通ヘリックス連結領域の部位特異的変異
生化学、74巻、8号、2002年8月25日

3. 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の細胞質ドメインに存在するイオンペアの役割
生化学、74巻、8号、2002年8月25日

4. Sanae Kato, Mika Kamidochi, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Wang Gouli, and Hiroshi Suzuki

Val²⁰⁰ residue in Lys¹⁸⁹-Lys²⁰⁵ outermost loop on the A domain of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase is critical for rapid processing of phosphoenzyme intermediate after loss of ADP sensitivity

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 11, 2003, March 14

5. Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, and Suzuki Hiroshi

Roles of ionic interactions between P and N domains of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

生化学、75巻、8号、2003年8月25日

6. Suzuki Hiroshi, Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Miyauchi Yuki, Iizuka Hajime, and Danko Stefania

Structure and function of Ca^{2+} pump and the molecular basis of genetic diseases caused by its mutations

生化学、75 卷、8 号、2003 年 8 月 25 日

7. Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Danko Stefania, and Suzuki Hiroshi

Roles and mechanism of domain movements and interactions in the Ca^{2+} pump

生化学、75 卷、8 号、2003 年 8 月 25 日

8. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Guoli Wang, Stefania Danko, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki

Deletions of any single residues in Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 40, 2003, October 3

9. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki

Multiple and distinct effects of mutations of Tyr¹²², Glu¹²³, Arg³²⁴, and Arg³³⁴ involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase
CHANGES IN CYTOPLASMIC DOMAIN ORGANIZATION DURING ISOMETRIC TRANSITION OF PHOSPHOENZYME INTERMEDIATE AND SUBSEQUENT Ca^{2+} RELEASE

The Journal of Biological Chemistry, 279, No. 3, 2004, January 16

10. Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki

Distinct Natures of Be/F-bound, Al/F-bound, and Mg/F-bound Stable Analogues of ADP-insensitive Phosphoenzyme Intermediate of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: Changes in catalytic and transport sites during phosphoenzyme hydrolysis

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 279, 2004, April 9

(2) 口頭発表

1. Suzuki Hiroshi, Danko Stefania, Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Kamidochi Mika, and Toyoshima Chikashi

Organization and roles of the cytoplasmic domains of Ca^{2+} -ATPase as revealed by site-specific proteolysis

10th International Conference on Na,K-ATPase & Related Cation Pumps、2002 年 8 月 9 日

2. 大保 貴嗣、山崎 和生、王 国麗、Danko Stefania、鈴木 裕
筋小胞体Ca²⁺-ATPaseのAドメイン-膜貫通ヘリックス連結領域の部位特異的変異
日本生体エネルギー研究会第28回討論会、2002年8月24日

3. 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕
筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の細胞質ドメインに存在するイオンペアの役割
日本生体エネルギー研究会第28回討論会、2002年8月24日

4. 大保 貴嗣、山崎 和生、王 国麗、Danko Stefania、鈴木 裕
筋小胞体Ca²⁺-ATPaseのAドメイン-膜貫通ヘリックス連結領域の部位特異的変異
日本生化学会、2002年10月17日

5. 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕
筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の細胞質ドメインに存在するイオンペアの役割
日本生化学会、2002年10月17日

6. Miyauchi Yuki, Yamasaki Kazuo, Sato Katsuhiko, Daiho Takashi, Takahashi Hidetoshi, Ishida-Yamamoto Akemi, Nakamura Satoshi, Suzuki Hiroshi, and Iizuka Hajime
Comprehensive and systematic analysis of function and expression of all the 51 missense mutants of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b found in Darier's disease patients
International Investigative Dermatology 2003、2003年5月1日

7. Sato Katsuhiko, Miyauchi Yuki, Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Nakamura Satoshi, Ishida-Yamamoto Akemi, Takahashi Hidetoshi, Suzuki Hiroshi, and Iizuka Hajime
Small changes in either or both Ca²⁺ affinity and Ca²⁺ transport rate in sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b will result in Darier's disease
International Investigative Dermatology 2003、2003年5月1日

8. Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, and Suzuki Hiroshi
Roles of ionic interactions between P and N domains of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
日本生化学会、2003年10月17日

9. Suzuki Hiroshi, Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Miyauchi Yuki, Iizuka Hajime, and Danko Stefania
Structure and function of Ca²⁺ pump and the molecular basis of genetic diseases caused by its mutations
日本生化学会、2003年10月18日

10. Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Danko Stefania, and Suzuki Hiroshi

Roles and mechanism of domain movements and interactions in the Ca^{2+} pump

日本生化学会、2003年10月18日

11. 宮内 勇貴、高橋 英俊、山本 明美、山崎 和生、大保 貴嗣、佐藤 克彦、鈴木 裕、飯塚 一

Darier's disease 患者に見出された51種の点変異 sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 蛋白の発現ならびに機能の総合的解析

第10回分子皮膚科学フォーラム、2003年11月

12. 山崎 和生、大保 貴嗣、王 国麗、Danko Stefania、鈴木 裕

小胞体 Ca^{2+} -ATPaseの反応サイクル中に起こる細胞質ドメイン間相互作用部位のダイナミックな変化と機能との関連

日本生体エネルギー研究会第28回討論会、2003年12月17日

13. 鈴木 裕、大保 貴嗣、山崎 和生、Danko Stefania、

Ca^{2+} ポンプの構造機能関連と遺伝子異常による細胞病態

日本生体エネルギー研究会第28回討論会、2003年12月17日

研究成果

1. 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase に Mg^{2+} と F^- が触媒部位に固く結合した $\text{Mg}^{2+}/\text{F}^-/\text{E}$ は、リン酸化中間体のアナログである。本研究では、その結晶化のために、可溶化 $\text{Mg}^{2+}/\text{F}^-/\text{E}$ が Ca^{2+} 非存在下で長期間完全に安定性を保つ条件を確立した(Yamasaki, *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277,13615 - 13619)。
2. 本酵素の細胞質側には A、P、N の 3 ドメインがある。A ドメインの Val²⁰⁰ ループと P ドメインとの相互作用が、 Ca^{2+} 結合型リン酸化中間体からの Ca^{2+} 遊離に必須であることを示した(Kato, *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 9624 - 9629)。
3. Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ ループは本酵素の A ドメインと膜貫通ヘリックス M1 をつないでいる。このループの適切な長さが、リン酸化酵素の構造転換に必須であることが強く示唆された。さらに、ダリエー病家系で発見された変異 $\Delta 41$ 、 $\Delta 42$ 、N39D、N39T ではこの反応段階が阻害されており、これらによる小胞体への Ca^{2+} 輸送の阻害が細胞内のカルシウムホメオスタシスを乱す可能性を示した(Daiho, *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 39197 - 39204)。
4. 本酵素 P ドメインの Arg³³⁴ がリン酸化酵素の異性化に必須であり、また A ドメインの Tyr¹²² は、リン酸化酵素の異性化の後、リン酸化中間体から Ca^{2+} が遊離する段階に必須であることを示した。これらより ATP 加水分解のエネルギーが細胞質ドメイン相互間の大きな動きを通じて膜貫通ドメインの Ca^{2+} 輸送部位へ伝達されるモデルを提出した(Yamasaki, *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 2202 - 2210)。
5. 本酵素 (E2) に Be^{2+} と F^- 、 Al^{3+} と F^- 、および Mg^{2+} と F^- が結合した $\text{Be}/\text{F}/\text{E}2$ 、 $\text{Al}/\text{F}/\text{E}2$ 、 $\text{Mg}/\text{F}/\text{E}2$ の複合体が本酵素のリン酸化中間体とその加水分解過程の安定なアナログであり、各々、基底状態、遷移状態、酵素・生成物複合体のアナログであることを示した。さらに、リン酸化中間体の加水分解過程における触媒部位の変化により Ca^{2+} 輸送路が閉じて小胞体内腔から Ca^{2+} を漏出させない構造が獲得されることを示した(Danko, *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 14991 - 14998)。

上記 1 から 5 の成果は以下に綴じた論文として国際誌に掲載された。