

---

筋小胞体カルシウムポンプのリン酸化部位近傍の構造と機能の解析

---

(10680576)

平成 10 年度～平成 11 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 12 年 2 月

研究代表者 大保 貴嗣

(旭川医科大学医学部助手)

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手)

## 研究経費

平成 10 年度	2, 200 千円
平成 11 年度	1, 000 千円
計	3, 200 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 1. 大保 貴嗣、山崎 和生、斎野 朝幸、鈴木 裕、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase N 末端ドメインの Ser6-Lys7-Ser8 は酵素の native conformation を安定化する

生化学、70 巻、8 号、1998 年 8 月 31 日

#### 2. 大保 貴嗣、鈴木 裕、山崎 和生、斎野 朝幸、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg198 への部位特異的変異導入は Pi から形成したリン酸化中間体の加水分解を抑制する

生化学、70 巻、8 号、1998 年 8 月 31 日

#### 3. Takashi Daiho, Hiroshi Suzuki, Kazuo Yamasaki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Mutations of Arg<sup>198</sup> in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Cause Inhibition of Hydrolysis of the Phosphoenzyme Intermediate Formed from Inorganic Phosphate

FEBS Letters, Vol.444, No.1, 1999 Feb 5

4. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Deletions or Specific Substitutions of a Few Residues in the NH<sub>2</sub>-terminal Region (Ala<sup>3</sup> to Thr<sup>9</sup>) of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Cause Inactivation and Rapid Degradation of the Enzyme Expressed in COS-1 Cells

The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.34, 1999 Aug. 20

5. 大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕、斎野 朝幸、金沢 徹

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase N 末端領域(Ala<sup>3</sup>-Thr<sup>9</sup>)における 2-3 残基の削除または特異的置換は失活と COS-1 細胞内での速い分解を引き起こす

生化学、71 巻、8 号、1999 年 8 月 25 日

6. 鈴木 裕、大保 貴嗣、山崎 和生、金沢 徹

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 分子あたり 1 個存在する ATP 結合部位のうち半数のみがリン酸化中間体を形成する触媒部位である

生化学、71 巻、8 号、1999 年 8 月 25 日

## (2) 口頭発表

1. 大保 貴嗣、山崎 和生、斎野 朝幸、鈴木 裕、金沢 徹

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase N 末端ドメインの Ser6-Lys7-Ser8 は酵素の native conformation を安定化する

第 71 回日本生化学会大会、1998 年 10 月 17 日

2. 大保 貴嗣、鈴木 裕、山崎 和生、斎野 朝幸、金沢 徹

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の Arg198 への部位特異的変異導入は Pi から形成したリン酸化中間体の加水分解を抑制する

第 71 回日本生化学会大会、1998 年 10 月 17 日

3. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Mutations of Arg198 in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Cause Inhibition of Hydrolysis of the Phosphoenzyme Intermediate Formed from Inorganic Phosphate

IX<sup>th</sup> International Conference on the Na/K-ATPase & Related ATPases, 1999 August 18

4. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Deletions or Specific Substitutions of a Few Residues in the  $\text{NH}_2$ -terminal Region (Ala<sup>3</sup> to Thr<sup>9</sup>) of Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Cause Inactivation and Rapid Degradation of the Enzyme Expressed in COS-1 Cells

IX<sup>th</sup> International Conference on the Na/K-ATPase & Related ATPases, 1999 August 18

5. Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Tohru Kanazawa

Only Half of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Molecules Present in Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Can Be Phosphorylated with ATP or Pi

IX<sup>th</sup> International Conference on the Na/K-ATPase & Related ATPases, 1999 August 18

6. 大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕、齋野 朝幸、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase N 末端領域(Ala<sup>3</sup>-Thr<sup>9</sup>)における 2-3 残基の削除または特異的置換は失活と COS-1 細胞内での速い分解を引き起こす

第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月 8 日

7. 鈴木 裕、大保 貴嗣、山崎 和生、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 分子あたり 1 個存在する ATP 結合部位のうち半数のみがリン酸化中間体を形成する触媒部位である

第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月 8 日

8. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Mutations of Arg198 in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Cause Inhibition of Hydrolysis of the Phosphoenzyme Intermediate Formed from Inorganic Phosphate

The Eleventh International Symposium on Calcium-Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, 1999 October 21

9. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Deletions or Specific Substitutions of a Few Residues in the  $\text{NH}_2$ -terminal Region (Ala3 to Thr9) of Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Cause Inactivation and Rapid Degradation of the Enzyme Expressed in COS-1 Cells

The Eleventh International Symposium on Calcium-Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, 1999 October 21

### (3) 出版物

1. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

The Na/K-ATPase and Related ATPases

Elsevier, North Holland (K. Taniguchi and S. Kaya Eds.), 2000, in press

2. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

The Na/K-ATPase and Related ATPases

Elsevier, North Holland (K. Taniguchi and S. Kaya Eds.), 2000, in press

3. Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Tohru Kanazawa

The Na/K-ATPase and Related ATPases

Elsevier, North Holland (K. Taniguchi and S. Kaya Eds.), 2000, in press

## 研究成果

以前に筆者は、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA1a) の Arg198 および His5 が触媒部位の近傍に存在することを示した。本研究では、Arg198 および N 末端領域 (Glu2-Ala14) のアミノ酸残基を部位特異的変異により削除あるいは置換した変異体を COS-1 細胞で発現させ、それらの機能を解析した。

1. Arg198 の部位特異的変異: R198 を親水性と正電荷を保つ Lys に置換しても ATPase 活性とリン酸化酵素 (EP、反応中間体) 濃度から求めた turnover rate は変化しなかった。親水性だが電荷を持たない Gln に置換すると若干減少した。他方、負電荷を持つ Glu や、疎水性の Ala, Ile に置換すると著明に減少した。EP の加水分解速度は、R198K では WT と同じであった。R198Q の分解は遅く、E、A、I 置換体では分解が著明に遅くなった。以上の結果は、198 番目のアミノ酸残基が親水性でかつ正電荷を持つ事が EP の速い加水分解に重要であることを示している。

2. N 末端領域の機能解析: Ala3-Ser6 領域の何れか 1 残基の削除、Ala3-Thr9 領域の連続した 2 残基以上の削除、あるいは A4K、A4D、H5K の置換によって COS-1 細胞での SERCA1a の発現が強く抑制された。1 残基の削除変異体を除いて、発現が強く抑制された変異体の特異的  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性は強く抑制された。COS-1 細胞での発現が強く抑制された変異体では、転写、翻訳、及び膜への挿入は障害されていないが、COS-1 細胞内での分解が WT に比べて非常に速いことが示された。変異体  $\Delta 3$  の COS-1 細胞での速い分解は、proteasome の特異的阻害剤 lactacystin によって強く抑制された。以上の結果より、SERCA1a の N 末端領域 (Ala3-Thr9) は小胞体での品質管理に感受性が高く、従って、この領域は本蛋白質の正しい folding または正しく fold した本蛋白質の安定性に重要であることが示唆された。