

---

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の部位特異的変異による  
作動機構の解析

---

(11680622)

平成11年度～平成12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13年2月

研究代表者 鈴木裕  
(旭川医科大学医学部教授)

## は し が き

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は ATP の加水分解に共役して、 $\text{Ca}^{2+}$ を細胞質から小胞体内腔へ輸送する。その触媒過程では、ATP の  $\gamma$ -リン酸基が Asp351 に転移してリン酸化中間体が形成し、続いてその異性化と加水分解が順次起こる。本研究では、触媒部位、特にリン酸化部位近傍の構造形成に関与する残基を同定しその機能を明らかにする事、ならびにリン酸化中間体の形成・異性化・加水分解に伴う高次構造変化（特に触媒部位を構成する細胞質 3 ドメインの動き）を明らかにする事により、輸送機構の深い理解を可能にする事を目的とした。

## 研究組織

研究代表者：鈴木 裕（旭川医科大学 医学部 教授）

## 研究経費

平成 11 年度	2,300 千円
平成 12 年度	1,400 千円
計	3,700 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 1. Hiroshi Suzuki and Tohru Kanazawa

Formation of the ADP-Insensitive Phosphoenzyme Intermediate in the Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of Which both Cys344 and Cys364 Are Modified by *N*-Ethylmaleimide.

Biochemistry, Vol.38, 820-825 (1999)

#### 2. 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, 54-58 (1999)

- 3 . 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, 23910-23915 (1999)
  
- 4 . Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Tohru Kanazawa  
  
Only half of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase molecules present in sarcoplasmic reticulum vesicles can be phosphorylated with ATP or Inorganic phosphate.  
  
Na/K-ATPase and Related ATPases. (K.Taniguchi and S.Kaya Eds.) Elsevier, North Holland, 381-388 (2000)
  
- 5 . Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa  
  
Deletions or specific substitutions of a few residents in the NH<sub>2</sub>-terminal Ala<sup>3</sup>-Thr<sup>9</sup> region of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase cause inactivation and rapid degradation of the enzyme expressed in COS-1 cells.  
  
Na/K-ATPase and Related ATPases. (K.Taniguchi and S.Kaya Eds.) Elsevier, North Holland, 293-296 (2000)
  
- 6 . Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Hiroshi Suzuki, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa  
  
Mutations of arginine-198 in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase cause inhibition of hydrolysis of the phosphoenzyme intermediate formed from inorganic phosphate.  
  
Na/K-ATPase and Related ATPases. (K.Taniguchi and S.Kaya Eds.) Elsevier, North Holland, 297-300 (2000)
  
- 7 . Stefania Danko, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Mika Kamidochi, Hiroshi Suzuki, and Chikashi Toyoshima  
  
ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin.  
  
FEBS Letters, Vol.489, 277-282 (2001)

8. 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。

生化学、71 巻、8 号、642 頁、1999 年

9. 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 の 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、935 頁、1999 年

10. 上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Val-200 への部位特異的変異導入は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を抑制する。

生化学、72 巻、8 号、886 頁、2000 年

11. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の共役に重要である。

生化学、72 巻、8 号、887 頁、2000 年

12. 山崎 和生、大保 貴嗣、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のマグネシウム・フッ素複合体は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  による可溶化に対して安定である。

生化学、72 巻、8 号、887 頁、2000 年

(2) 口頭発表

1. 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.

IXth INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE Na/K-ATPase & RELATED ATPases,  
August 19, 1999

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

DELETION OR SPECIFIC SUBSTITUTION OF A FEW RESIDUES IN THE NH<sub>2</sub>-TERMINAL REGION (Ala3 TO Thr9) OF SARCOPLASMIC RETICULUM Ca<sup>2+</sup>-ATPase CAUSE INACTIVATION AND RAPID DEGRADATION OF THE ENZYME EXPRESSED IN COS-1 CELLS.

IXth INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE Na/K-ATPase & RELATED ATPases,  
August 23, 1999

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

MUTATION OF Arg198 IN SARCOPLASMIC RETICULUM Ca<sup>2+</sup>-ATPase CAUSE INHIBITION OF HYDROLYSIS OF THE PHOSPHOENZYME INTERMEDIATE FORMED FROM INORGANIC PHOSPHATE.

IXth INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE Na/K-ATPase & RELATED ATPases,  
August 23, 1999

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

Mutations of Arg198 in Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-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, October 21, 1999

- 5 . 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 (Ala3 to Thr9) of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-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, October 21, 1999

- 6 . 大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕、齋野 朝幸、金沢 徹

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の N 末端領域 (Ala3-Thr9) 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。

生体エネルギー研究会第 25 回討論会、1999 年 8 月 23 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. 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 の 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

9. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の共役に重要である。

生体エネルギー研究会第 26 回討論会、2000 年 9 月 15 日

10. 上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Val-200 への部位特異的変異導入は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を抑制する。

第 73 回日本生化学会大会、2000 年 10 月 13 日

11. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の共役に重要である。

第 73 回日本生化学会大会、2000 年 10 月 13 日

12. 山崎 和生、大保 貴嗣、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のマグネシウム・フッ素複合体は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  による可溶化に対して安定である。

第 73 回日本生化学会大会、2000 年 10 月 13 日

## 研究成果

本研究では、部位特異的変異、蛋白化学的手法、酵素反応速度論的解析、ならびに細胞分子生物学的手法を利用して、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の構造と機能について、次のような成果を得た。

1. Asp351 近傍の  $\text{SH}_D$  (Cys344 & Cys364) を *N*-エチルマレイミド修飾するとリン酸化中間体 (EP) の異性化がブロックされるが、水の活動度を下げて触媒部位からの水分子の排除を促進すると、 $\text{SH}_D$  修飾酵素でも EP の異性化が生起することを発見した。これにより、EP の異性化に必須である触媒部位からの水分子排除に  $\text{SH}_D$  領域はきわめて重要であることを明らかにした。
2. 本酵素の細胞質領域は3つのドメイン (リン酸化、ATP 結合、及び A ドメイン) からなる。これまで機能が不明であった A ドメインについての部位特異的変異により、このドメイン中の Arg198 は EP の迅速な加水分解に必須であり、加水分解時にはリン酸化部位のごく近傍に位置することを明らかにした。
3. A ドメイン中の His5 とその近傍領域は、EP 加水分解時にリン酸化部位近傍に位置すること、この領域は小胞体による品質管理に感受性が高く、細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 蛋白が正常で安定な高次構造を形成し発現するために必須であることを、部位特異的変異と細胞内における蛋白発現・分解の解析により、明らかにした。
4. Trypsin、proteinase K、及び V8-protease による切断実験により、EP の異性化に伴い  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase はこれら proteases に対し強く抵抗性のコンパクトな構造となること、この構造は細胞質の3つのドメインが集まった構造であることを明らかにし、ATP 加水分解過程で細胞質の3つのドメインが大きく動くことを明らかにした。

以上の成果は、以下に綴じた論文として、国際誌に掲載された。