
筋小胞体カルシウムポンプ E2PCa 中間体からの
カルシウム放出機構の解析

18570119

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 山 崎 和 生

旭川医科大学 医学部 助教

<はしがき>

この報告書は平成 18-19 年度科学研究費補助金（基盤研究（C）「筋小胞体カルシウムポンプ E2PCa 中間体からのカルシウム放出機構の解析」研究代表者：山崎和生）研究成果をまとめたものである。

研究組織

研究代表者： 山崎 和生（旭川医科大学・医学部・助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	0	3,890,000

研究発表

(1) 学術雑誌

Takashi Daiho

Critical Role of Glu40-Ser48 Loop Linking Actuator Domain and First Transmembrane Helix of Ca²⁺-ATPase in Ca²⁺ Deocclusion and Release from ADP-insensitive Phosphoenzyme

Journal of Biological Chemistry, vol. 282, (2007) 34429-34447

Yuki Miyauchi

Comprehensive Analysis of Expression and Function of 51 Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Mutants Associated with Darier Disease

Journal of Biological Chemistry, vol. 281, (2006) 22882-22895

Masaki Yoshida

ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers keratinocyte differentiation

Journal of Dermatological Science, vol.43 (2006) 21-23

(2) 学会発表

Kazuo Yamasaki

The Ca²⁺ bound ADP-insensitive Phosphoenzyme of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Mutant

20th IUBMB Interbational Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress

June 19, 2006 京都 国際会議場

Poster

Takashi Daiho

Role of the region linking cytoplasmic and transmembrane domains in processing of phosphorylated intermediates for Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

20th IUBMB Interbational Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress

June 19, 2006 京都 国際会議場

Poster

山崎 和生

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 放出過程における Tyr¹²²-Hydrophobic cluster と K^{+} との関連

第80回日本生化学会、第30回日本分子生物学会合同大会

2007年12月14日 パシフィコ横浜

Poster 及び 口頭

大保 貴嗣

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 変異体による Ca^{2+} を閉塞した ADP 非感受性リン酸化中間体のアナログの形成

第80回日本生化学会、第30回日本分子生物学会合同大会

2007年12月14日 パシフィコ横浜

Poster 及び 口頭

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

研究成果

平成18年度

Ca^{2+} 結合量測定法の妥当性の検証と精度の向上

これまでにCOS-1で発現させたSERCA1aに結合した Ca^{2+} 量を測定する方法として、⁴⁵Caを結合させ、メンブレン上にトラップしたmicrosomeを、ATPと高濃度Caの入ったwasher使うことにより、すべての Ca^{2+} -ATPase分子をE1PCaに変換して、結合した Ca^{2+} を酵素内に閉塞させつつ洗うという方法を開発した。この方法により、発現させたSERCA1a変異体を用いた、 Ca^{2+} 結合の測定が可能となり、Tyr¹²²をAlaに置換した変異体(Y122A)において、通常蓄積しないE2PCa中間体が蓄積していることが示唆された。しかしながら、この方法で測定した場合、野生型ではATPからEPを形

成させ定常状態にあるときのCa²⁺結合量がE1Pよりむしろ低い目にする傾向があったため、その原因について検討してみた。

Rapid filtration system (RFS) を用いた測定では、野生型SERCA1aを高濃度Ca²⁺存在下でATPからEP形成を行った場合、結合していたCaは直ちに閉塞され、安定に保持されるが、低濃度Ca存在下で形成したEPに高濃度Caを添加した場合には、高濃度Ca²⁺存在下で形成したEPよりも速いCa²⁺の脱離が観察された。これは、Ca²⁺-ATPaseの触媒部位のmetal結合部位がCaに置換される速度が、比較的遅いため、E1PCaや、E2PCaのトラップが遅れ、結合したCaと内側のCaとが交換しているものと考えられる。この結果は、このCa²⁺結合量測定法を用いる場合に、中間体の状態によっては、Ca結合量を低めに見積もる可能性を示唆しており、wash時間のコントロールが測定精度向上に不可欠であることを示している。また、このことから、E1PCaやE2PCaに結合したCa量は低めに見積もられるに関わらず、明らかにE1P量を上回るCa結合量があるということは、E2PCaの存在はより確実になったといえる。

E2PCaからのCa放出速度の見積もり

E2PCaからのCa放出速度を見積もるため、Y122Aの代わりにL119Aを用いてCa releaseのタイムコースを測定したところ、このmutantでE1P-E2P転換より、Ca放出が明らかに遅くなっていることを示すデータが得られた。

平成19年度

Tyr122 Hydrophobic-cluster (Y122-HC) を構成する残基のCa²⁺ 放出機構での役割の解析

Y122-HCを構成する各残基をアラニンに置換した変異体を作成し、定常状態におけるE2P蓄積量のCa濃度依存性から、各変異体のE2PのLumen側Ca²⁺に対する親和性を見積もったところ、110-330 μMという値が得られた。また野生型のE2Pに関してはこれまで、このCa²⁺結合の親和性は直接見積もることが出来なかったが、今回はじめて、E2PへのCa²⁺結合速度とE1PからのCa²⁺放出速度から、この親和性が1.5mMであると見積もることができた。この結果はこれらの変異体すべてで、内腔向きのCa²⁺親和性が野生型と比較して高くなっていることを示しており、能動輸送において重要な、放出側でのリガンドとの親和性の低下を引き起こすメカニズムにおいて、Y122-HCが非常に重要な役割を持っていることが示された。次に内腔側からのCa²⁺結合速度を見積もったところ、どの変異体もほぼ同じ速度であったが、その速度は野生型と比較して顕著に低下していることが示された。この結果は変異体において内腔側のCa²⁺ゲートが十分にE2Pでも十分に開いていないことを示唆するものであり、Y122-HCがCa²⁺親和性の低下だけではなく、内腔側のCa²⁺ゲートの開放にも重要な役割を持つことを示している。

野生型Ca²⁺-ATPaseを用いた解析

一連の解析の中で新たに野生型Ca²⁺-ATPaseでもK⁺が存在しない条件では、E2PのCa²⁺に対する性質がY122-HCを非常に似通っていることが明らかになった。Ca²⁺-ATPaseの内腔側へのCa²⁺放出機構にK⁺イオンが重要な役割を果たしている

という結果は今回初めて得られたものであり、 Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} 輸送の分子機構を考える上で、非常重要的な知見である。